

**SEJTCIKLUS SPECIFIKUS GÉNEK
SZABÁLYOZÁSA A NÖVÉNYI NÖVEKEDÉS ÉS
FEJLŐDÉS SORÁN**

Ph.D. értekezés

Dr. Kovácsné Lendvai Ágnes

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet

Témavezetők:

Prof. Dudits Dénes

Dr. Györgyey János

Szeged

2007

Rövidítések	3
I. BEVEZETÉS.....	4
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
II.1. A sejtciklus.....	5
II.1.1. Sejtciklus kutatás kezdete	7
II.2. Szinkronizációs rendszer.....	8
II.3. Ciklin-függő kinázok (CDK)	9
II.3.1. Növényi CDK gének - fehérjék	11
II.3.2. A CDK aktivitásának szabályozása növényekben	12
II.4. Retinoblasztóma-szerű fehérjék (RBR)	14
II.4.1. Retinoblasztóma a vírusok célpontja	15
II.4.2. Retinoblasztóma a sejtciklus szabályozó	16
II.4.3. Retinoblasztóma, mint a növényi növekedés kontrollálója	18
III. CÉLKITŰZÉSEK.....	19
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	20
IV.1. Növényi anyagok.....	20
IV.2. Sejtmagizolálás és áramlásos citometriai mérés.....	20
IV.3. Rizs kallusz indukció.....	21
IV.4. Alkalmazott bináris vektorok	21
IV.5. Transzformáns rizs növények előállítása Agrobacterium tumefaciens közvetített génbeviteli módszerrel	21
IV.6. Fehérjeizolálás	22
IV.7. Western Analízis	23
IV.8. A MsRBR gén klónozása	23
IV.9. A rizs OsRBR gének klónozása	24
IV.10. A búza TaRBR1 és TaRBR2 gének meghatározása.....	24
IV.11. Szekvencia összehasonlítások és filogenetikai analízis	24
IV.12. RNS izolálás	25
IV.13. DNáz kezelés és reverz transzkripció.....	26
IV.14. Kvantitatív RT-PCR	26
IV.15. In vitro RNS transzkripció.....	27
IV.16. In situ hibridizáció.....	27
IV.17. Élesztő két-hibrid mátrix analízis.....	28
V. EREDMÉNYEK.....	29
V.1. Szinkronizációs kísérletek	29
V.1.1. Az Unggi9 sejtkultúra szinkronizációs kísérlete	30
V.1.2. A Taipei-309 sejtkultúra szinkronizációs kísérletek.....	33
V.1.3. A szinkronizáció hatékonyságának ellenőrzése sejtciklus függő gének expressziós szintjének vizsgálatával	35
V.2. Növényi CDK kinázok szerepe a növényi fejlődés során.....	38
V.2.1. A Medsa;CDKA1;1 kináz kifejeztetése transzformáns növényekben.....	40
V.2.2. A Medsa;CDKB1;1 túltermeltetésének hatásai rizs növényekben	42
V.2.3. A Medsa;CDKB2;1 kifejeztetetésének hatásai rizsnövényekben.....	44
V.3. Növényi retinoblasztóma-szerű gének és fehérjék vizsgálata	46
V.3.1. Retinoblasztóma-szerű gének azonosítása lucernában, rizsben és búzában	46
V.3.2. A növényi RBR gének exon-intron felépítése	49

V.3.3. Növényi retinoblasztóma-rokon fehérjék összehasonlító filogenetikai vizsgálata	50
V.3.4. A növényi RBR gének kifejeződésének jellegzetességei	53
V.3.5. RBR gének expressziós analízise mRNS <i>in situ</i> hibridizációval.....	56
V.3.6. Az RB-szerű fehérjék szelektivitása fehérje kölcsönhatásokban	58
VI. KÖVETKEZTETÉSEK	60
VI.1. Szinkronizációs kísérletek	60
VI.2. Lucerna Ciklin függő kinázok túltermeltetésének hatásai rizs növényekben	61
VI.3. Növényi retinoblasztóma-szerű fehérjék	64
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	68
VII.1. Rizs sejtek szinkronizációja	68
VII.2. Lucerna CDK fehérjék túltermeltetésének tanulmányozása rizs növényekben	69
VII.3. A növényi RBR gének és kifejeződésük tanulmányozása	70
VIII. IRODALOM JEGYZÉK	72
IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	88
X. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	89
X.1. A dolgozat alapját képező publikációk:	89
X.2. Egyéb publikációk:	89
XI. PhD theses	90
XI.1. Synchronization of rice cells	92
XI.2. Studying the overproduction of Medicago CDK proteins in rice plants	93
XI.3. Studying the plant RBR genes.....	93
XII. Függelék	96

Rövidítések

2,4-D	2,4-diklórfenoxi ecetsav
BAP	6-benzil-adenin
<i>bar</i>	foszfinotricin-acetil-transzferáz (PAT) enzimet kódoló gén
bp	bázispár
dNTPs	dezoxi-nukleotid-trifoszfát-keverék
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamino-tetraecetsav
HU	hidroxiurea
IAA	indolecetsav
kb	kilobázis
PCR	polimeráz láncreakció
PMSF	fenilmetilszulfonil fluorid
PPT	foszfinotricin
PVDF	polivinilidén-difluorid
RB	retinoblasztóma
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
CaMV35Spromóter	karfiolmozaikvírus 35S szedimentációjú fehérjét kódoló gén
promótere	

I. BEVEZETÉS

Az állati és növényi rendszerek különböznek egymástól az általános egyedfejlődési stratégiájukban és a környezeti adaptációjukban. A sejtfal megléte és helyhez kötött életmódjuk miatt a növények nem képesek olyan helyváltoztató mozgásra, mint az állatok és nincs sejtvándorlás sem a fejlődési folyamatuk és a környezeti változásokra adott válaszok során. A sejtek dedifferenciálódásához és utólagos differenciálódásához szükséges a sejtek osztódásának reaktivációja, amely új sejt típusok és szervek kialakulását eredményezi, így teljesül a környezeti hatásokra adott válasz. Rugalmas, ugyanakkor nagyon pontos szabályozási rendszer feltételezhető, amely fontos előfeltétele a fejlődési program megvalósulásának és a környezeti változásokhoz való alkalmazkodásnak.

A szabályozó mechanizmusok közül az egyik a sejtosztódás folyamata, amely meghatározó a különböző környezeti változásokhoz való alkalmazkodásban. A sejtciklus egy nagyon pontos rendszer, mert biztosítani kell a genetikai örökítőanyag tökéletes fennmaradását. A sejt és molekuláris biológiai kutatás egyik kiemelkedő területe, mivel minden élőlény esetében alapvető szabályozó rendszer.

Az elmúlt évtizedben különösképpen megnövekedett a figyelem a növényi sejtosztódással kapcsolatban, ugyanis a konzervált alapmechanizmusokon túl, érdekes csak növényeknél megtalálható sejtciklus sajátosságokat fedeztek fel. A tudomány megkívánja, hogy minél több részletét ismerjünk meg a sejtosztódásnak, ez irányú kutatásokhoz a növények kivételes lehetőséget nyújtanak. Az állatokkal ellentétben, a növényi fejlődés nagymértékben posztembrionális. Az új szervek, mint a gyökér, szár, levelek és virágok ún. „life-long” sejtek osztódásából erednek, amit növekedésük és differenciálódásuk követ. Ez a specifikus sejt zóna a merisztéma. A levelek és virágok a hajtás merisztémából képződnek, illetve a gyökér merisztéma, amely állandóan új sejteket képez a növekvő gyökérben. Mindezen sajátosságokból adódóan a növények a igen alkalmasak, hogy egyszerre tanulmányozzuk a többsejtű élőlények sejtciklusát, növekedését és fejlődését.

Kutatásaink az egyszikű növények sejtosztódás specifikus jellegzetességeire irányultak, hogy tovább bővítsük ezen ismereteket, ugyanakkor a már felhalmozódott információhalmazban az egyes sejtes mechanizmusok közötti kapcsolatokat-összefüggéseket vizsgáltuk.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. A sejtciklus

A sejtciklus egyike a leginkább tanulmányozott biológiai folyamatoknak, mely különösen fontos szerepet tölt be a növekedésben, fejlődésben. A mitotikus sejtosztódás során a szervezet örökítőanyaga megduplázódik és két leánysejtbe különül. Ezen sejtosztódási folyamatnak megfelelően szabályozottnak kell lennie, hogy elkerülje a genetika információba való hiba kerülését. A sejtciklus négy egymást követő fázisba szerveződik, ami időben elkülöníti a genetikai anyag replikációját az S fázist, és a megduplázódott kromoszómák két leánysejtté való elkülönülését a mitózist (M fázis), és ezen lépéseket az úgynevezett „Gap” (G) fázisok kötik össze. A gap fázisok elkülönítik az aktív fázisokat egymástól és közben ellenőrzik a sejtciklus során stimulált mitogenetikus jeleket, a sejt megfelelő méretét és előkészítik a sejteket az aktív fázisra.

A G1 fázis, az egyik ún. „nyugalmi fázis”, amelybe a mitózis befejeztével kerül a sejt, és ebből indul tovább a DNS replikációs fázisba, amely során a sejtben összetett folyamatok indukálódnak a különböző jelmolekulák által. A G1/S fázis közötti átmenet kiemelkedő szabályozó pontja a sejtciklusnak. A G1/S fázis átmenet egy meghatározott mitogenetikus stimulációra indul, amikor a sejt kész a sejtosztódásra. Növekedés indukáló faktorok aktiválják azon specifikus szenzorokat, amelyek közvetítik a fehérjék transzlációját, a sejt növekedését és a sejtciklus aktiválást (Hunt és Nasmyth, 1997). Amikor a sejtek felkészültek az osztódásra az ún. restriktós pontba érkeznek (élesztőben START), amely meghatározott a G1 fázisban, de nincs specifikus szabályozás alatt, viszont lehetséges, hogy a különböző szignálok védelme alatt van, míg a G1/S átmenethez jut a sejt (Cooper, 2003).

A genetikai anyag megkettőződését (S fázis) követően a sejt újra egy „nyugalmi” állapotba kerül, amit a megduplázódott DNS mennyiséggel lehet megkülönböztetni a G1 fázistól. A G2 fázisból a mitózisba kerülés (G2/M átmenet) szintén meghatározó lépés a sejtosztódásban, ami elindítja a kromoszómák két sejtbe való szegregációját (M).

A sejtciklus szabályozása egy rendkívül bonyolult és összetett folyamat, amelyben sejten belüli és sejten kívüli tényezők egyaránt szerepet játszanak. (1. ábra) Sejten belül a sejtciklus fő szabályozói olyan fehérjekomplexek, amelyek katalitikus hatású és szabályozó alegységből állnak.

A katalitikus alegységek ún. fehérjekinázok, amelyek más fehérjék specifikus régióihoz foszfátsoportot képesek kapcsolni, ezzel pedig megváltoztatni e fehérjék aktivitását. A katalitikus alegységek mennyisége a sejtciklus során nem felétlenül változik, de önmagukban nem aktívak, viszont a szabályozó alegység kötődésével ezen kinázok aktívvá válnak. Mivel e szabályozó alegységek mennyisége a sejtciklus során jellegzetesen változik, a ciklin elnevezést kapták. Az általuk regulált fehérjekinázokat ciklin-függő kinázoknak (Cyclin-Dependent Kinase, röviden CDK) nevezték el.

Mind a ciklinek mind a ciklin-függő kinázoknak több formája létezik. Egy-egy specifikus ciklin és CDK összekapcsolódása révén alakulnak ki a sejtciklus szabályozásában főszerepet játszó fehérjekomplexek, amelyek különböző típusai a sejtciklus különböző pontjain fejtik ki hatásukat. Felépülésüket a ciklin mennyiségének növekedése előzi meg, amely viszont általában valamilyen más indukáló tényezőnek (például növekedési faktoroknak) az eredménye (Dylnacht, 1997).

A sejtciklus szabályozásával kapcsolatos összehasonlító analízisek által sok evolúciósan konzervált sejtciklust kontrolláló gént azonosítottak. A magasabbrendű növények esetében szintén izolálták ezeket a géneket, de a pontos szerepüket nehéz megmondani a növényi genomok összetettsége miatt, mégpedig a kulcsfontosságú gének többszörös jelenléte miatt, mint például a CDK esetében is.

majd az ezt követő kutatások megállapították, hogy az alap mechanizmus konzervált minden eukariótában, és a legtöbb alkotóelemet a 90-es évek elején azonosítottak növényekben is. A sejtciklust szabályozó elemeinek részletes tanulmányozásához szükséges vizsgálati rendszer melyben az egyes fázisok jól elkülöníthetők, ez a szinkronizációs rendszer.

II.2. Szinkronizációs rendszer

A növény osztódó, merisztematikus zónáiban lévő sejtek alapvetően aszinkronban osztódnak, azaz nem szabályozott az osztódási idő az egyes sejtek között. Sejtbiológiai nézőpontból, mint a fehérjék sejtben elhelyezkedését figyelembevéve, egyedi sejteket tanulmányozhatók, amihez nem szükséges az osztódási idő azonossága a sejtek között. Viszont a sejtosztódás biokémiai és molekuláris analiziséhez elengedhetetlen egy olyan sejtszisztem megléte, ahol a populációban lévő sejtek osztódása szinkronba hozható. Habár bizonyos mértékben a szinkron megvalósítható ép csíranövényekben és növényi szövetekben különböző inhibitorokkal, blokkoló anyagokkal, de a legalkalmasabb rendszernek az *in vitro* növény sejtkultúrák bizonyultak a sejtciklus részletes vizsgálatához. Egy sejttenyészetben a sejtek többsége aktív és osztódik, így keresztülmegy a sejtciklus egyes fázisain. Egy ilyen rendszerben, a sejtosztódás sokféleképpen befolyásolható. Ezen eljáráshoz ismernünk kell azokat a módszereket, mellyel a sejteket a sejtciklus egy adott pontjában megállíthatjuk, majd ebből a pontból újra tudjuk indítani a sejtek osztódási folyamatát.

A megközelítések közül a legfontosabb, hogy olyan reverzibilis inhibitorokat alkalmazzunk, amelyek a sejtciklust egy adott ponton képesek megállítani, így a sejtek azonos fázisba - ún. szinkronba - kerülnek. Ez lehetséges egyes tápanyagok vagy más faktorok megvonásával, ami szabályozza a sejtek ciklusát. A leggyakrabban alkalmazott ilyen inhibitor az aphidicolin, mely egy DNS-polimeráz gátló vegyület, s így a sejteket korai S fázisban állítja meg (Ohashi és mts., 1978). A másik gyakran használt gátlószer a hidroxürea, mely a sejteket késő G1, korai S fázisban tartja, mivel ez a szer a DNS szintézist gátolja, a ribonukleotid redukáz blokkolása révén (Yarbro, 1967). A sejteket korai mitózisban blokkoló vegyületek: a propizamid egy herbicid, valamint a kolhicin mely vegyületek a mikrotubulusok gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. A tápanyag megvonásos módszer, sokkal körülményesebb,

hosszabb időt igénybevevő technika, ahol elsősorban a szénhidrát-, vagy a foszfátforrást vonják meg a sejtektől, úgymond „éheztetik” a sejteket.

Számos sejt kultúra alkalmas különböző mértékben szinkronizáltan fejlődni, mint például az *Acer*, *Catharantus roseus*, *Medicago*, *Nicotina plumbaginifolia* és szója esetében már ismert. Az eddigi legkiemelkedőbb szinkronizációs módszert azonban dohány, *Nicotiana tabacum*, Bright Yellow-2 (BY-2) sejt vonalon érték el Nagata és Kumagai (1999), s így a növényi sejt ciklus tanulmányozásának egyik legfontosabb kísérleti eszköze lett. További eredményes módszereket dolgoztak ki Magyar és mts. (1997) lucerna sejttenyésztésre, valamint a kétszikűek modell növényére, egy *Arabidopsis* sejt vonalra a szinkronizációs módszerét Menges és mts. (2002) dolgozták ki. Egyszikű növények esetében nem ilyen széles a rendelkezésre álló sejt kultúrák és szinkronizációs módszerek palettája. Kukorica sejt szuszpenziót Peres és mts. (1999) részlegesen szinkronizáltak hidroxipireával, valamint Fabian és mts. (2000) *Oryza sativa* var. Indica spp. IR48 rizs sejttenyésztés esetében próbálkozott szinkronizációs technikával, amellyel a rizs ciklinA1;1 és cdc2Os3, mint a ciklin-CDK komplex alegységeit vizsgálták. A sejt ciklus folyamatának szabályozó egységeinek ismerete nélkülözhetetlen.

II.3. Ciklin-függő kinázok (CDK)

Az eukarióta sejt ciklus szabályozása összetett folyamat, amelynek az egyik legfontosabb koordinátorai a ciklin-függő kinázok (CDK). Ezek a szerin-treonin fehérje kinázok - működésüket tekintve a sejt ciklust szabályozó - ciklineket kötve (komplextet képezve) határozzák meg az egyes sejt osztódási lépéseket.

A sejt ciklus szabályozása sokféle ciklin kifejeződésével függ össze, ami a sejt ciklus bizonyos fázisaival (G1, S és M) kapcsolt, amit a megfelelő CDK partner fehérjék befolyásolnak. Bizonyították, hogy az egyes CDK-ciklin komplexek szuppresszálnak más típusú ciklinek szintézisét ill. aktivitását, s ugyanakkor aktiválják azt a mechanizmust, amely saját destrukciójukhoz vezet. Tehát a sejt ciklus során különböző típusú CDK-ciklin komplexek követik időben egymást, s váltakozásukat az előző fázis komponenseinek proteolitikus lebontása kényszeríti ki.

A sejt ciklus szabályozása a következőképpen alakul a szomatikus emlős sejtekben a CDK-ciklin komplex szabályozása révén (Fisher, 1997). A G1 fázisban a G1-típusú ciklinek (ciklin D és E) játszanak fontos szabályozó szerepet és ezek

menyisége a sebesség-meghatározó lépés. A G1-ciklinek szintézise a sejtnövekedéshez kapcsolódik, és ez biztosítja, hogy a sejtek ne lépjenek át addig az S fázisba, míg az osztódáshoz ideális méretet el nem érték. Ha a sejt mérete egy bizonyos határértéket túllép, akkor a G1-es ciklin-függő kináz aktivitása hirtelen megnő. Az aktív kináz komplex elkezd a megfelelő fehérjeszubsztrátokat foszforilálni, s ezzel beindítja a következő folyamatokat. A destruktív boxokat tartalmazó ciklinek (S- és M-típusú ciklinek) proteolitikus lebontását, hogy ezen ciklinek ne képezhessenek a CDK fehérjével komplexet. Az S fázishoz szükséges transzkripciót meghatározó gének kifejeződése megnövekedik, hogy a bioszintézisekhez és a szerkezet kialakításhoz szükséges (pl. hisztonok) fehérjék megfelelő mennyiségben rendelkezésre álljanak. A G1/S átmenetet gátló foszforilált CDK inhibitor proteolitikus úton lebontásra kerül, ami azt eredményezi, hogy a felhalmozódott CDK kináz aktivitása az S fázisban hirtelen ugrásszerűen megnő. Ez a hirtelen aktivitás-növekedés kell ahhoz, hogy a DNS szintézis a replikációs startpontoknál elinduljon (Fotadar R. és Fotadar A., 1995).

Az S fázis során specifikus ciklinek (ciklin A) szintetizálódnak, s ezek aktiválják a megfelelő CDK kinázokat. Amikor a sejtek az S fázis végére érnek, egy tirozin-kináz foszforilálja, s ezáltal inaktiválja a CDK-t. A G2 fázisban megjelennek a mitotikus ciklinek (ciklin B), s a mitózis során ezek aktiválják a specifikus CDK fehérjét. Az aktiválás azonban csak akkor eredményes, ha a CDK tirozinja defoszforilálódik, és ha a CDK-hoz ún. CKS dokkoló faktorok kötődnek. A CKS-eken keresztül további (+ vagy -) szabályozó molekulák kötődhetnek a CDK-hoz. A mitózis folyamán az S- és M-típusú ciklinek proteolitikusan degradálódnak, ezzel a G1-típusú ciklinek szintézise a gátlás alól - ami az S fázistól a telofázisig tart - felszabadul. A G1-típusú ciklinek lassú felhalmozódása a ciklus újbóli megindulásához vezet.

A folyamat során a komplexek reverzibilis aktiválódását ill. inaktiválódását specifikus kinázok (CAK) szabályozzák, amely a CDK-kat a specifikus treoninon (Thr 160) foszforilálják. A fehérje komplexek inaktiválását különböző foszfátázok végzik, a foszfát-csoportok eltávolításával. A komplex funkcióját az ún. CDK inhibitorok (CKI) is szabályozzák azáltal, hogy kötődnek az aktivált CDK-ciklin komplexhez és megakadályozzák, hogy kifejtse kináz-aktivitását.

Habár ez az alapmechanizmus konzervált minden eukariótában, a növényeknél sajátos a sejtciklus szabályozása mind molekuláris mind regulációs szinten.

II.3.1. Növényi CDK gének - fehérjék

Minden eukariótában megtalálható egy 34 kDa nagyságú fehérje kináz, amelynek központi szerepe van a sejtosztódás szabályozásában. Az első *cdc2* kináz gént élesztőben (*Schizosaccharomyces pombe*) azonosították *cdc2* néven (Nurse és Thuriaux, 1980), aminek megfelelő homológ szekvenciája állati és növényi rendszerekben is ismert. Az állati rendszerekben a különböző CDK-kat számokkal jelzik, addig a növényi CDK elnevezésénél (összehangolva az állati rendszerekével) betűkkel különböztetik meg a különböző (CDKA, B, D, E, F) funkcionális csoportokat. A növényi CDK 5 típusba osztályozták, amelyek közül az F-típusú CDK nem mutatnak sejtciklus jellemző sajátságokat, mint a CDKA,1 a PSTAIRE motívuma. A CDK fehérjék két csoportját tanulmányozták, elsősorban növényekben, az A- és B-típusú CDK-kat (Ferreire és mts., 1991).

A növényekben a CDKA fehérjékre a PSTAIRE szekvencia motívum jellemző a ciklin-kötő doménben, ezek a kinázok a G1/S és G2/M átmeneteket szabályozzák. A CDKA1 transzkriptum felhalmozódása sejtciklustól független mintázatot mutat, amíg a sejtkivonatok hiszton 1 kináz aktivitása G1/S átmenetben, G2 és M fázisokban magas, ami kapcsolatban van az A-típusú CDK fehérjék jelenlétével. A növényi CDKA csoportba tartozik a *cdc2MsA* és *cdc2MsB* *Medicago*-ból izolált gének, mivel az általuk kódolt fehérjékben megtalálhatók a kinázokra jellemző ciklin-kötő motívum, a PSTAIRE. Ebbe a csoportba tartozó gének a sejtciklus során az S, G2 fázisokban és mitózisban mutatnak magas kináz aktivitást, valamint képesek komplementálni az élesztő *cdc2/CDC28* mutációját.

Négy B-típusú CDK ismert, melyek növény-specifikus CDK-ák a rájuk jellemző PPTALRE vagy PPTTLRE motívummal, amelyek a G2 és M fázisba halmozódnak fel és a G2/M átmenetet szabályozzák. Ezen kinázok vizsgálatából ismert, hogy nem képes komplementálni az élesztő *cdc2/cdc28* mutánsokat (Imajuku és mts., 1992, Fobert és mts., 1996) A B-típusú CDK-k aktivitása a G2/M fázisok közötti átmenethez kapcsolt, habár a CDKB1;1 mRNS szintjének növekedése már az S fázisban elkezdődik. (Segers és mts., 1996) A CDKB2 gén transzkriptumának felhalmozódása is szigorúan G2 és M fázis specifikus és mindkét B-típusú CDK-nak maximális kinázaktivitása a mitózis alatt van (Porceddu és mts., 2001). A CDKB1;1 feltehetően kölcsönhat mitotikus ciklinnel, valamint a CDKB1;1 és *cycB1;1* gének is

koordinált transzkripciós felül-szabályozottságot mutatnak a G2 és M fázisok során (Mironov és mts., 1999).

A C-típusú CDK, PITAIRE és SPTARE motívummal rendelkeznek. Ezekről megfigyelték, hogy nem vesznek részt a sejtosztódás szabályozásában, mivel nem fejeződnek ki osztódó sejtekben (Barroco és mts., 2003). Lucerna sejt kultúrában a CDKC kifejeződése konstitutívnak bizonyult Magyar és mts. (1997) kísérletei alapján. A növényi D-típusú CDK-k az állati CDK aktiváló kinázoknak felelnek meg (CAK). Ezek a kinázok aktivitásukkal a transzkripcionális szabályozásában vesznek részt (Umeda és mts., 1999; Yamaguchi és mts., 2000). Mind *Medicago*ban mind *Arabidopsis*ban azonosítottak egy-egy E-típusú gént és ezen gének mRNS szintje azonos volt a sejtciklus során (Magyar és mts., 1997). Lehetséges sejtciklus szabályozó szerepüket még tanulmányozzák.

II.3.2. A CDK aktivitásának szabályozása növényekben

A növényi G1/S átmenet szabályozása nagyon hasonlít más magasabbrendű eukariótákéhoz, még akkor is ha nem azonosították a CDK4/6, CDK2 és ciklin E fehérje homológokat növényekben (Rossi és Varotto, 2002). A CDKA,1/ciklin D komplex aktivitását a G1/S fázisátmenetben is bizonyították növényekben, ami a transzkripciót gátló retinoblasztóma fehérje hiperfoszforilációjához vezet (Soni és mts., 1995; Meijer és Murray, 2000; Boniotti és Gutierrez, 2001). A retinoblasztóma inaktiválásával az E2F/DP transzkripciós faktorok szabaddá válnak, így az S fázis specifikus gének kifejeződésének gátlása megszűnik a növényekben is (Magyar és mts. 2000; Kosugi és Ohashi, 2002; De Veylder és mts., 2002). Növényekben a CDK4 és 6 kinázok mellett az INK4 CDK inhibitor sem azonosították. Azonban hét CDK gátló fehérjét ún. Kip-szerű (KRP) proteint kódoló gént viszont azonosítottak. A KRP fehérjék funkcionális tulajdonságai alapján feltételezhető, hogy ezen fehérjék a CDK/ciklin komplexek inaktiválásában vesznek részt, mivel a CDK inhibitorok (CKI) általi CDK/ciklin komplex szabályozás konzervált növényekben. A hét KRP gén különböző kifejeződési mintázata arra utal, hogy különböző CDK/ciklin komplexeket szabályoznak szövetspecifikusan (De Veylder és mts., 2001). A KRP fehérjék általi szabályozáson túl, a fehérjék egy csoportja az ún. dokkoló faktoroknak és a CDK alegységeknek (suc/cks) nevezett fehérjék is módosítják a CDK-k kináz aktivitását. Két *Arabidopsis* CKS fehérjét jellemeztek eddig (De Veylder és mts., 1997; Stals és

mts., 2000). A CKS fehérjékhez való kapcsolódás a kinázkomplex konformációjának változásához vezet és további CDK-k válnak célponttá mind pozitív mind negatív irányú szabályozás révén.

A CDK-k kináz aktivitása poszt-transzlációs szinten is szabályozott, a foszforiláltsági állapotuk vagy épp defoszforiláltságuk révén. Az *Arabidopsis* CDKA1 aktívvá válásához szükséges a konzervált treonin aminosav foszforilálása a CAK kináz által (Stals és mts., 2000; Joubes és mts. 2000). A növényi CAK fehérjék kölcsönhatnak a H-típusú ciklinekkel (Yamaguchi és mts., 2000) és képesek funkcionálisan komplementálni az emberi és élesztő CDK-kat is (Umeda és mts., 1998; Shimatohno és mts., 2003). Habár növényekből *cdc25* génnek megfelelő gént nem azonosítottak, *Arabidopsis*-ban egy hasonló foszfátáz szintén képes aktiválni a CDKA1 fehérjét a G2/M fázis átmenetben. Lucerna esetében a PP2A foszfátáz gátlása a G2-M fázis korai szakaszán aktiválta a lucerna mitotikus kinázt (Medsa;CDK2;1), ami a fragmoplasztképződés elmaradásával párosult (Ayaydin és mts., 2000)

A CDKA1 génben okozott domináns negatív mutáció, amely kifejeződését a karfiolmozaik vírus 35S promóterrel fejeztették ki, az embriók elhalásához vezettek *Arabidopsis*-ban. Ugyanez a mutáció embrió specifikus promóterrel (albumin gén 252) kifejeztetve az embriók kialakulásához vezetett (Hemerly és mts., 2000). A sejtosztódás aktivitásának gátlását a CaMV35S-*cdc2a.N147* heterológ kifejeztetésével vizsgálták, ami normálisan differenciálódott leveleket eredményezett, de ezen levelek kevesebb ugyanakkor nagyobb sejtekből épültek fel (Hemerly és mts., 1995). A CDK dokkoló faktor, CKS transzgénikus túltermeltetése *Arabidopsis*-ban a levél méretének és a gyökér növekedési rátájának csökkenéséhez vezetett, mivel megnövekedett a sejtciklus időtartama és lecsökkent a merisztematikus zóna (De Veylder, 2000). A CDK aktiváló kinázok túltermeltetése fokozatosan csökkentette a CDK fehérjék aktivitását és az iniciális gyökér sejtek differenciálódását (Umeda és mts., 2000). CDK inhibitorok, KRP1 és KRP2 túltermeltetése erősen gátolta a mitotikus sejtek osztódását és megváltozott levélforma (fogazott) kialakulásához vezetett (Wang és mts., 2000; De Veylder és mts., 2001). Minden esetben a sejtosztódás aktivitása csökkent a CDKA₁ aktivitásának változása miatt, valamint néhány esetben korábbi differenciálódást eredményezett. Néhány növényi D-típusú ciklin ektopikus kifejeztetése hasonló fenotípust eredményezett, mint ahogy a CDKA kísérleteknél tapasztalták. A *cycD3,1* ektopikus kifejeztetése sejtméret csökkenéshez és megváltozott sejtciklus időtartamhoz vezetett. A fejlődő és érett levelekben a sejtszám

növekedését tapasztalták, de a sejtek teljes differenciálódását is megfigyelték (Dewitte és mts., 2003). Mindezen ismeretek sugallják, hogy a sejtciklus nagyon összetett folyamat, amelyben a különböző kinázok más fehérjékkel fejtik ki szabályozó szerepüket.

II.4. Retinoblasztóma-szerű fehérjék (RBR)

A CDK-ciklin komplex(ek) szubsztrátjai közé tartoznak a retinoblasztóma fehérjék, amely a sejtciklus szabályozó lépéseiben játszik fontos szerepet és meghatározza a sejtosztódás folyamatát. Az állati sejtekben, az ún. „pocket proteinek” a retinoblasztóma gének termékei.

A retinoblasztóma-related (RBR) fehérje család (RB, p107, p130 emlősökben) elsődlegesen a G1/S fázisok közötti átmenetet gátolja, közvetlenül (az E2F transzkaktivációs doménjének kötésével) és közvetve (megerősítve különböző kromatin-remodelling komplexeket és ezáltal „elhallgatva” specifikus kromatin régiókat) az E2F/DP transzkripció faktor családon keresztül. Az aktív RBR fehérjék jelenléte gátolja a G1 fázisban az E2F által szabályozott gének kifejeződését, megelőzve a sejtek S fázisba jutását. Állati rendszerekben, a fejlődési és mitogenikus jelekre válaszul, az RBR fehérjék inkativálódnak méghozzá a specifikus CDK/ciklin komplexek végezte foszforilálódásuk által, így megszűnik számos E2F függő promóter blokkja. Az RBR aktivitás szintén lehet gátolt, méghozzá a sejtciklus során stimulált specifikus inhibitorok, néhány onkovirális fehérje által, mint például a SV40 (Simian Virus) T-antigénje, vagy az adenovírus (Ad) E1A és az emberi papillomavírus (HPV) E7 fehérjéje által.

Az első növényi retinoblasztóma homológ szekvenciadarabot kukorica cDNS könyvtárból azonsították Grafi és mts., 1996-ban. Ezt követően további két RBR szekvenciárészletet (*ZmRBR2a* és *ZmRBR2b*) határoztak meg Ach és munkatársai, 1997-ben, melyek a már teljes hosszúságban ismert *ZmRBR1* gén allélikus variánsai. A kukoricából ismert szekvenciák közötti megegyezés több mint 90%. Minden ismert növényi retinoblasztóma-szerű fehérje nagymértékű konzerváltságot mutat a szerkezetében. A feltételezett aminosav-sorrendek összehasonlítása által meghatározták az állati RB fehérjékre jellemző A és B doméneket is. A kukorica *RBR* gén homológjának azonosítása és vizsgálata elősegítette további növényi *RBR* gének meghatározását, így például az *Arabidopsis* RBR-t is. Ezidáig a következő kétszikű

növényekben azonosították az *RBR* gént: dohány, libatop, lúdfű, borsó, hibrid nyárfa, valamint csibehúr. Az egyszikű növények esetében a kukoricán kívül a kókusz *RBR* homológ szekvenciája ismert. Mindezen szekvenciáknál meghatározható az *RB* családra jellemző A/B pocket domének helye, amik ezen géneknek evolúciósan konzervált egységei, így feltételezhető a géntermékek funkcionális konzerváltsága is. Majdnem minden azonosított *RB* homológ, köztük a növényi *RB*-szerű fehérjék is tartalmazzak egy sejtmagi lokalizációs szignált (NLS) és egy cisztein aminosav is nagyon konzervált a B doménban. Az *RBR* fehérje majdnem minden biokémiai tulajdonságát elveszti, ha mutálódik ezen konzervált cisztein (Ach és mts., 2000). Az retinoblasztóma fehérje szerkezetének ismerete segítséget nyújt a funkciójának megismerésében is.

II.4.1. Retinoblasztóma a vírusok célpontja

Növényekben az *RBR* működési mechanizmusa is különböző kölcsönhatások által szabályozott, az állati rendszerekhez hasonlóan. A növényi sejtciklus kutatás során a *RB*-t kötő *LxCxE* motívumot több fehérje esetében azonosították, így a növényi D-típusú ciklinekben (Huntley és mts., 1998), *E2F* transzkripció faktoroknál (Sekine és mts., 1999), *KRP* fehérjéknél (Pettkó-Szandtner és mts., 2006), valamint vírusok replikációs fehérjeiben (*RepA*), például a búza dwarf vírus (Grafí és mts., 1996) és a kukorica csíkoltság vírus (Horváth és mts., 1998) esetében. A növényi *RBR* kutatás úttörőjeként Grafí és mts. (1996) kimutatták, hogy a *ZmRBR1* fehérje kölcsönhat olyan emlős virális onkoproteinekkal, mint a SV40 T antigénje, az adenovírus *E1A* fehérjéje, és a HPV *E7* proteinje is. A növényi *RBR* fehérjék növényi vírus fehérjékkel is kölcsönhatnak, mivel a vírusok nukleinsavának megsokszorozódásához elegendhetetlen, hogy a gazdasejtek replikációs mechanizmusa aktiválódjon. A növényi retinoblasztóma-szerű fehérjék szerepét a vírusos fertőzéseknel alaposan tanulmányozták már (Horváth és mts., 1998; Gutierrez, 2000). A geminivírusok kis egyszálú DNS-e kétszálú DNS-en keresztül replikálódik a gazda növény replikációs rendszerét használva (Settlage és mts., 2001). Mivel a differenciálódott növényi sejtek már nem képesek replikációra, így a geminivírus fertőzés korai szakaszában a vírus indukálja a gazda növény DNS replikációs enzimeit (Hanley-Bowdoin és mts., 1999). Ezt a feltételezést differenciálódott TGMV fertőzött sejtekben a proliferációs sejtmagi antigén (*PCNA*), a DNS polimeráz δ

felhalmozódásának kimutatásával támasztották alá. (Nagar és mts., 1995, Kong és mts., 2000).

A geminivírusok célja, hogy a gazda RBR fehérjéjének inaktiválásával a gazdasejtet újra sejtciklusba léptessék és a DNS replikációjára kényszerítsék. A különböző geminivírusok kétféle módon lépnek kölcsönhatásba a növényi RBR fehérjékkel. Az egyik az LxCxE motívumra épül, melynek a vírusfehérjékben jelen kell lennie, mint a RepA fehérjében a Mastrevírusok esetében. A Begomovírusok esetében a vírusfehérje (mint az AL1 a TGMV-ben) az RB-kötő motívumtól független úton kapcsolódik a növényi RBR fehérjéhez és készíti a gazdasejtet a genetikai anyagának sokszorozására (Gutierrez, 2000). Bizonyított, hogy a Mastrevírus által kódolt replikáció asszociált fehérje (RepA) kölcsönhat a növényi RBR fehérjékkel. A RepA fehérje hatását mérsékelni tudták a ZmRBR1 fehérje túltermeltetésével. A RepA fehérje növelte a transzformációs hatékonyságot és a kallusz növekedési arányát kukorica csírából. Ezen tanulmányok bemutatták, hogy a RepA fehérje stimulálja a sejtosztódást az RBR fehérjék szabályozásán keresztül (Gordon-Kamm és mts., 2002).

Az AL1 vírus, illetve annak replikációs faktora elegendő a gazda sejtciklusának indukálásához kölcsönhatva a sejtciklus szabályozó RBR fehérjével. További eredmények bizonyítják, hogy a TGMV AL1 RBR-kötő aktivitásban mutáns fehérje segítségével nem jön létre fertőzés, ami azt sugallja, hogy a RBR kötés egy általános sajátossága a gazda aktivációnak minden szöveti típusban (Kong és mts., 2000). Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy az RBR fehérje az elsődleges célpont egy vírusfertőzés esetén, kihasználva annak sejtciklus szabályozó szerepét.

II.4.2. Retinoblasztóma a sejtciklus szabályozó

Az állati rendszereknél ismert RB sejtciklus szabályozásra alapozva, elsőként Nakagami és mts., 1999-ben kimutatták, hogy az RBR fehérje foszforilálódik a ciklin/CDK komplex által növényekben is. Az RBR fehérjék növekedést csökkentő aktivitását annak foszforilációja szabályozza, a ciklin-függő kinázok által. Az RBR funkciójának ezen inaktivációja az egyik legfontosabb lépés a G1-S fázis átmenetben (Nakagami és mts., 1999). Az RBR fehérjék magasabbrendű eukariótákban szabályozzák a sejtosztódást azáltal, hogy befolyásolják az adenovírus E2 promotor kötő faktor (E2F) és a transzkripció faktorok dimerizációs partner (DP) család

közötti kölcsönhatást, amelyek befolyásolják több sejtciklusban szerepet játszó gén kifejeződését. A G1/S fázisátmenet során a CycD/CDK komplex foszforilálja az RBR-t így az E2F transzkripciós faktor felszabadul gátlás alól és S fázisba indítja a sejteket.

Az RBR kölcsönhat a CycA2 fehérjével is, szabályozva a sejtciklust (Roudier és mts., 2000), megerősítve azt a feltételezést, hogy az RBR nemcsak a G1-S, hanem a G2-M átmenetben is szerepet játszik. A növényi RBR-kel kapcsolatot kialakító kináz komplex CDKA kinázt és D-típusú ciklin fehérjét tartalmaz (Boniotti és Gutierrez, 2001), de más CDK komplexek is képesek foszforilálni az RBR fehérjét. Az RBR fehérjékkel kapcsolatos kinázokat vizsgálva, Koroleva és mts. (2004) megállapította, hogy a kináz aktivitás folyamatosan növekszik a korai S fázistól a mitózisig, ami arra utal, hogy a RBR foszforilációjának nemcsak az S fázisban, hanem a G2 fázisban is fontos szerepe van.

Az RBR szabályozó szerepére a változó fehérje mennyisége is utal, amit a kukorica levél fejlődése során tapasztaltak. Az azonosított ZmRBR1 fehérje szintje a már differenciálódott levélcsúcs felé egyre nő (Nakagami és mts., 1999). A kukorica RBR fehérjék mind mennyiségben, mind foszforilációs állapotban változnak az endoreduplikációval együttesen az endospermiumban (Grafí és mts., 1996). Ugyanakkor Gordon-Kamm és munkatársai kimutatták, hogy a *ZmRBR1* gén túltermeltetése gátolja a sejtosztódást dohány BY2 sejtekben. Az ún. CAF-1 (kromatin „assembly” faktor 1) is kölcsönhatnak az RBR-vel, ami által feltételezhető, hogy a RBR-E2F/DP útvonalnak szerepe van az embriónális/vegetatív átmenetben (Ach és mts., 1997). Sejtszinten, a RBR gének megnövekedett szupressziója sejtprolifерációt okoz az egyébként már differenciálódott szövetekben. A RBR gének szupressziója extra DNS replikációt is okozott endoreduplikálódó levél sejtekben. Ezek a hatások megnövelt E2F transzkripcióval is kiválthatók voltak. Növényekben az RBR funkcióvesztéses vizsgálata ektopikus sejtosztódáshoz vezetett a főbb szövetekben, amely egybevághat a sejtdifferenciálódás késésével, illetve a megnövekedett endoreduplikációval. Ezen kísérletek is azt mutatják, hogy a RBR koordinálja ezeket a folyamatokat a növényi szövet kialakulás során (Park és mts., 2005).

II.4.3. Retinoblasztóma, mint a növényi növekedés kontrollálója

A sejtcikluson kívüli, de azzal összekapcsolódó folyamatokat is szabályoz a RBR a különböző fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulásán keresztül, így például a FVE fehérjével (AtMSI4), „polycomb” fehérjével, a CLF (Curly Leaf) fehérjével, illetve a FIE (Fertilization Independent Endosperm) fehérjével (Mosquna és mts., 2004). A retinoblasztómával kölcsönható fehérje az FVE is (Ausin és mts., 2004), amely egy fehérje-komplex része, ami represszálja a FLC (Flowering Locus C) transzkripcióját az RBR kapcsolt hiszton deacetiláción keresztül, így az RBR-nek szerepe van a virágzás szabályozásában is. A különböző RBR génekben mutáns növények hozzásegítenek, hogy megismerjük ezen gén növényfejlődés során kifejtett hatását. A lúdfű inszerciós mutáns vizsgálata a hím ivari gametofiták elhalásához vezetett (Ebel és mts., 2004).

Az RBR szabályozza a gyökér alapi sejteinek méretét és számát is. A D ciklinek, KIP-kapcsolt fehérjék, illetve az E2F faktorok túltermeltetése szintén befolyásolja a gyökér alapi sejteinek méretét, így ezen molekuláris kölcsönhatások azt sugallják, hogy ezek a faktorok az ismert RBR útvonalon keresztül hatnak a szomatikus „stem” sejt kialakulásában, úgy mint azt állati rendszerek esetén már leírták (Wildwater és mts., 2005). Az endospermium fejlődése során a kukorica RBR3 kifejeződése a mitotikus állapotra korlátozódik, amely az endoreduplikáció bekapcsolódását előzi meg (Sabelli és Larkins, 2006). A hajtáscsúcsi merisztémában RBR fehérje tranziens túltermeltetése megindította a merisztéma sejtek kezdeti stádiumú differenciálódását. Az RBR fehérjék szerepet játszanak a gyökércsúcsi merisztémában lévő „stem” sejtek differenciálódási folyamatában. Ezen kísérleti eredmények tudatában megállapították, hogy a RBR fehérjéknek központi szerepe van a merisztéma sejtek differenciálódási folyamatainak szabályozásában (Wyrzykowska és mts., 2006).

A növényi szövetdifferenciálódás és felépítés egy szigorú és pontos szabályozást feltételez a sejtciklusban. A sejtosztódási ciklus meghatározott idejű és lokalizált aktivitásán túl az osztódási síkok iránya és elhelyezkedése is fontos. A növényi RBR fehérje kölcsönhatásainak, valamint funkciójának vizsgálatai tovább erősítik azt az irányvonalat, hogy az RB fehérjéknek kiemelkedő szerepe van a növények sejtciklusában és a növényi fejlődésben is. Vizsgálatainkkal további ismereteket kívántunk szolgáltatni az RBR szabályozó szerepéről.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Az egyszikű növények esetében is a sejtciklus tanulmányozásához egy jól kidolgozott szinkronizációs rendszer szükséges, mint az irodalmi adatokat ismerve, a dohány BY-2 sejtvonalnál, mellyel bővíthetnénk ismereteinket az egyszikűek sejtciklusának vizsgálata terén, ugyanakkor az egyszikű és kétszikű növények közötti evolúciós különbségek megismerésre is teret biztosítana.

Ezért munkánk céljaként a szinkronizációs technika optimalizálását választottuk, és ezt a módszert kívántuk fejleszteni kísérleti modellünkre, a rizsre. Vizsgálatainkkal tovább kívántuk növelni azokat az ismereteket, amelyek a sejtciklus szabályozás megértését elősegítik.

A ciklin-függő kinázok (CDK) központi szerepe már bizonyított a sejtciklus szabályozásában. Munkánk célja volt további ismereteket gyűjtése arról, hogy a CDK kinázok sejtosztódást szabályozó funkciója milyen befolyással bír a növényi növekedésre, fejlődési ütemére. Ezen tanulmányhoz a kiválasztott kinázokat túltermelő transzgénikus növények létrehozását és vizsgálatukat választottuk.

Ismert, hogy az élőlények alapmechanizmusai hasonlóak, így a sejtciklus szabályozó alapelemei is konzerváltak. Ezen reguláló egységek közül a növényi RBR gének, mint a sejtciklus egyik legérdekesebb mozgatórugója, különösen a rizs RBR azonosítását, vizsgálatát tűztük ki célul.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Növényi anyagok

Modell növényeink a rizs *Oryza sativa* L. *Japonica* cv. Taipei-309 valamint az Unggi9 fajta. A Taipei 309 genotíusból nevelt sejtvonalat AA tápoldatban (lásd. Függelék) növesztettük 2 mg/l 2,4-D diklórfenoxiecetsavat (2,4-D) jelenlétében, a tápoldat heti frissítésével, míg az Unggi9 sejt kultúrát G1 tápoldatban (lásd. Függelék) hasonló hormon koncentrációval és a tápoldat heti frissítésével.

Medicago sativa L. *ssp. varia* A2 genotípusú sejtenyészetet steril körülmények között, 22°C-on 16:8 órás fotoperiódus alatt neveltük a 0,2 µM 2,4-D és 1 µM kinetint tartalmazó folyékony MS (Murashige és Skoog, 1962) táptalaj heti frissítése mellett (Magyar és mts., 1997).

RNS izoláláshoz az említett növényi fajtákból üvegházban nevelt növények 2 hetes és kifejtett növényi részeiből mintákat gyűjtöttünk, valamint a sejt kultúrákból a kezelések során minden vizsgált időpontban mintát vételeztünk, melyeket folyékony nitrogénben fagyasztottunk és -80°C-on tároltunk a felhasználásig.

IV.2. Sejtmagizolálás és áramlásos citometriai mérés

A sejtmag izolálásához az ún. “chopping” módszert alkalmaztuk. A szuszpenzióból vett mintákról eltávolítottuk a tápoldatot, majd 1 ml steril Galbraith pufferben (40 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 30 mM Nátrium-citrát; 25 mM MOPS; 0,1% Triton-X-100; pH-t 7,0) feltártuk a sejteket pengével. A sejtmagszuszpenziót 20 µm pórusméretű mikrofilteren szűrtük. A minták nukleinsav tartalmát végkoncentrációban 4 µg/L Propidium-jodid alkalmazásával vizsgáltuk, Becton Dickinson FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) Calibur áramlási citométerrel. Méréseink során a SoftFlow Hungary Kft. által forgalmazott FACSTFlow elnevezésű puffer (nátrium-klorid, dinátrium-EDTA, kálium-klorid, kálium-foszfát, nátrium-foszfát) használtuk. A mért adatok rögzítéséhez és tárolásához a CellQuest 3.3 szoftvert alkalmaztuk. Az adatok kiértékelését a ModFit LT 2.0 program használatával végeztük el.

IV.3. Rizs kallusz indukció

Rizs szemekből kalluszt indukáltunk steril körülmények között. A szemek felszíni sterilizéséhez először 75%-os etanollal mostuk a szemeket 5 percig, utána 3x5 percig steril vízzel mostuk. Ezt követően frissen készített 50%-os hipoklorid oldattal 30 percig ráztuk a szemeket. Ezen kezelést 5x5 perces steril vizes mosás követett. A steril szemeket kalluszindukáló NB táptalajra (Li és mts., 1993), mely 2 mg/L 2,4-D-t tartalmazott, állandó 25 C°-on és sötétben neveltük körülbelül 5 hétig.

IV.4. Alkalmazott bináris vektorok

A *cdc2MsA/ Medsa;CDKA1;1*, *cdc2MsD/ Medsa;CDKB1;1*, *cdc2MsF/ Medsa;CDKB2;1* gének kifejeződésének vizsgálatához a pCAMBIA 3300 (Hajdukiewicz és mts., 1994) vektorra alapoztuk a konstrukciókat. A lucerna cDNS könyvtárból (Magyar és mts., 1997) *Medsa;CDKA1;1*, *Medsa;CDKB1;1* és a *MedsaCDKB2;1* gének kódoló szekvenciákat EcoRI/SmaI enzimekkel emésztettük ki, és az EcoRI/Ecl136II enzimekkel emésztett pH3 vektorba ligáltuk, így készült a pHEXD2A, pHEXD2D és pHEXD2F konstrukciók, melyek a hiszton promótert és azt követően a vizsgálandó kináz gének tartalmazzák. A pHEXD2F plazmidból az expressziós kazetta NotI enzimmel lett kivágva, majd Klenow-val bluntolva és a pCAMBIA3300 SmaI helyre lett klónoztva, így készítettük el a végleges bináris vektorokat a pCHD2A, pCHD2D, pCHD2F (lásd Függelék)

IV.5. Transzformáns rizs növények előállítása *Agrobacterium tumefaciens* közvetített génbeviteli módszerrel

A vizsgálandó gének bejuttatására Hiei és mts., 1994 által kidolgozott módszeren alapuló transzformációs kísérleteket végeztünk, *Agrobacterium tumefaciens*-szel kalluszokat fertőztünk (Hiei és mts., 1994).

Az egyes plazmidokat tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404-es törzseket antibiotikus YEP táptalajra (yeast extract, 10 g/l; peptone, 10 g/l; sodium

chloride, 5 g/l; pH 7.0) masszívan leoltottuk, 28 C°-on 3 napig növesztettük. A baktériumtenyészetet 5 ml R2M tápoldatban (Christensen és mts., 1997) felszuszpendáltuk. A transzformálni kívánt friss kalluszokat 50 ml R2M kiegészítve 2,5 mg/l 2,4-D-vel, 10 g/l glükózzal, 0,1 mM acetosziringonnal, 100 mg/l streptomocinnel (pH5.2) tápoldatba helyeztük, valamint hozzáadtuk a homogenizált baktériumtenyészetet és 15 percig infiltráltuk a kalluszokat. Az inkubálást követően további 50 ml együttnevelő R2M tápoldatot adtunk a tenyészetéhez és 2 napig 100 rpm-n ráztuk. A friss kalluszok egy részét kontrollként kezeltük, melyek nem érintkeztek baktériummal, de az infiltrációs és inkubációs kezelést szintén elvégeztük. Az együttenyésztést követően a tápoldatot eltávolítottuk és 1000 mg/l augmentinnel kiegészített 100 ml R2M tápoldattal mostuk a kalluszokat, és szárítottuk, majd R2 alapú 2,5 mg/l 2,4-D, 400 mg/l augmentinnel és 4 mg/l PPT-vel kiegészített táptalajon, sötétben neveltük a kalluszokat.

A szelekciós nyomást túlélő kalluszokat LS táptalajon (Rueb és mts., 1994), melyet 400 mg/l augmentinnel és 4 mg/l PPT-vel egészítettünk ki, további 4-5 hétig tenyésztettük embrióindukálás elősegítése végett. Majd ezt követően a kalluszokat LS regeneráló, PPT-t már nem tartalmazó táptalajra helyezve fényen inkubáltuk a tenyészeteket a gyökér- és a hajtásképződés megindulásához. A zöld levéllel és fejlődő gyökérrel rendelkező növényeket 4 mg/l PPT-t tartalmazó LS táptalajon tovább szelektáltuk. Az így regenerált növényeket üvegházban 28-30 C°-os nappali hőmérsékleten, 25x25 cm-es edénybe ültetve általános virágföld-tőzeg keverékben szemérésig neveltük.

IV.6. Fehérjeizolálás

Fehérje analízishez a transzformált növények különböző részeiből mintákat gyűjtöttünk, melyet folyékony nitrogénben fagyasztottunk és -80°C-on tároltunk a felhasználásig. Ezen növényi mintákból extrakciós puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 75 mM NaCl, 1 mM NaF, 60 mM β-glicerofoszfát, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 10 µl/ml proteináz inhibitor keverék) alkalmazásával izoláltunk összfehérjét. A fehérjekoncentrációt Bradford-reagenssel, 595 nm-en spektrofotométerrel határoztuk meg. Az immunoblot (Western blot) kísérletekhez mintaként 50 µg összfehérjét használtunk fel.

IV.7. Western Analízis

A mintákban található fehérjéket tömegük szerint SDS PAGE (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis) technikával választottuk szét. Az elektroforetikus elválasztást követően a gélből a fehérjéket PVDF (polivinilidén-difluorid) membránra transzferáltuk elektroblottolással. A filtereket tejporos oldatban két órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk 5% tejport és 0.05% Tween 20-at tartalmazó TBS (25 mM Tris-CL, pH8.0, 150 mM NaCl) pufferben, majd az adott elsődleges ellenanyaggal $1 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ IgG koncentrációban egy óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az alkalmazott elsődleges ellenanyagok a lucerna MedsaCdc2A (EYFKDIKFVP), MedsaCdc2D (PYFDSLDKSQY), MedsaCdc2F (DDLDKTHL) (Mészáros és mts., 2000) fehérjék C terminális peptidjét felismerő ellenanyagok, melyek mindegyike előzőleg affinitás-tisztításon esett keresztül. Az elsődleges ellenanyaggal történt inkubáció után a membránt mostuk 0,2% Tween 20-t tartalmazó TBS-vel. Mosás után a membránt peroxidáz enzimmel kapcsolt másodlagos ellenanyag tejporos oldatában inkubáltuk a gyártó (Sigma) által javasolt koncentrációban. Újabb mosás után a peroxidáz enzim szubsztrátjával („Lumi-Light Western Blotting Substrate”, Roche) kezeltük a membránt, a lumineszcenciát pedig röntgen filmen detektáltuk.

IV.8. A MsRBR gén klónozása

Az *MsRBR* gén első 305 bp hosszú részletét a következő oligók (forward primer 5'-TCCAAGTTGTACTATAGG-3', és reverz primer 5'-TGCCATGCTTTCCAAAAG-3') használatával izoláltuk λ ZAPII cDNS könyvtáron végzett PCR amplifikációk elvégzésével. A felhasznált oligók tervezéséhez a *ZmRBR2a* szekvencia (Garfi és mts., 1996) konzervált A-domének ismerete nyújtott segítséget. A λ ZAPII cDNS könyvtár 3-4 napos, nitrogént még nem fixáló lucerna noduszokból, *Medicago sativa* ssp. *Varia*-ból (Savouré és mts., 1995) készült, amit Dr. Kondorosi Évának és munkatársainak (Institut des Sciences Végétales, CNRS, Gif-sur-Yvette Cedex, France) köszönhetünk. A teljes hosszúságú *MsRBR* gén

szekvenciáját további PCR alapú technikával és az eredményezett szekvencia részletek elemzésével határoztuk meg.

IV.9. A rizs OsRBR gének klónozása

A rizs retinoblasztóma homológ gének azonosításához az ismert *MsRBR1* szekvencia 1521 bp hosszú, a konzervált B domén-től a C-terminális végig terjedő régióját használtuk fel próbaként a cDNS könyvtár screenelésnél. A PCR-alapú cDNS könyvtár készítéséhez SMARTTM cDNA Library Synthesis Kit-et (Clontech) használtuk. A kiválasztott pozitív klónok szekvencia meghatározását követően az *OsRBR1* (Acc.:AY941774) és *OsRBR2* (Acc.:AY941775) géneket sikerült azonosítani.

IV.10. A búza TaRBR1 és TaRBR2 gének meghatározása

A rizs OsRBR1 and OsRBR2 fehérje szekvenciákat használtuk fel tBLASTn alapú szekvencia keresésekhez a TIGR (http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=wheat) búza (*Triticum aestivum*) adatbázisban. Az alábbi tentatív konszenzus (TC) szekvenciákat eredményezte a homológiára alapozott összehasonlító keresés: (TC52591, TC 43330, TC 39220, TC52174, és TC46259). Ezen szekvenciadarabokból rekonstruáltuk a búza *TaRBR1* és *TaRBR2* retinoblasztóma homológok feltételezett szekvenciáját. Erre alapozva búza cDNS-eken PCR amplifikációt végeztünk a következő oligonukleotidekkel TaRBR1F (Forward 5'-GAATTCGGCACGAGGCAGGCAGAGT-3'), TaRBR1R (Reverse 5'-CAATTAAAACAAGGTGAAGTTTTACCCCACTGC-3'), és TaRBR2F (Forward 5'-GTTTTTCATTCAAATTTGAGAAGTT-3') TaRBR2R (Reverse 5'-GCAGGATCGGAAGAGGCAGGGACAC-3').

IV.11. Szekvencia összehasonlítások és filogenetikai analízis

A genomiális szekvencia adatbázisokban tBLASTt keresést végeztünk a vizsgálandó *RBR* gének exon-intron szerveződésének meghatározásához, és a

STRECHER program (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/stretcher.html>) alkalmazásával határoztuk meg a pontos exon-intron határokat.

A ClustalW programot (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/ClustalW.php>) használtuk többszörös szekvencia-összehasonlításokhoz. A phylogenetikai távolság meghatározásához a szekvencia összehasonlítás eredményét az ún. alignment-et a PHYLIP szerveren (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phytip-uk.html>) további analízisnek vetettük alá (Felsenstein, 2002).

IV.12. RNS izolálás

Össz-RNS izolálása TRI reagens módszer alkalmazásával és annak optimalizálásával végeztük (Chomczynski és Sacchi, 1987). A sejteket (0,2 g) folyékony nitrogénben finom porrá dörzsöltük, majd RNáz mentes körülmények biztosítása mellett hozzáadtunk 1 ml TRI reagenst (23,7 g guanidine thiocyanate; 12,5 ml 100 mM Na - citrát (pH 7,0); 10 ml 2M K - acetát (pH 4,8); 715 µl 35 %-os sarcosyl; 60 ml DEPC - vel kezelt dH₂O, 340 µl β - merkaptotanol; 50 ml vízzel telített fenol). Az elegyet 30 másodpercig homogenizáltuk, majd ezt követően 3 percig 65 °C – on inkubáltuk. Ezt követően 200 µl kloroformot hozzáadtunk és erőteljesen összeráztuk, majd legalább 3 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Utána 4 °C-ra előhűtött centrifugában 15 percig (10,000 x rpm) centrifugáltuk. A minták felülúszó részét átpipettáztuk egy-egy 1.5 ml-es eppendorf csőbe és mindegyik mintához 500 µl izopropanolt adtunk, majd legfeljebb 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Majd újra 15 percig 4 °C-on centrifugálással (10,000 x rpm) szétválasztottuk a különböző fázisokat, majd a csapadékot 70 %-os etanollal mostuk. A mosást követően 50 µl steril desztillált vízben feloldottuk az izolált összRNS-t. Az izolált összRNS mennyiségét, 240 nm optikai denzitását (OD₂₆₀) spektrofotométerrel határoztuk meg és az RNS minőségére OD₂₆₀/OD₂₈₀ arányából következtettünk, illetve megvizsgáltuk elektroforetikus elválasztással ethidium-bromid-ot és 1% formaldehidet tartalmazó agaróz gélen. Az izolált RNS mintákat -80°C-on tároltuk.

IV.13. DNáz kezelés és reverz transzkripció

Az RNS minták genomi DNS szennyezettségtől való megtisztításához DNáz kezelést végeztünk (10 x DNáz puffer; 5 µl DNáz (FERMENTAS); 25 µl össz RNS; 15 µl dH₂O). Az elegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd 65 °C-on 10 percig inaktiváltuk az enzimet, a FERMENTAS cég használati útmutatója szerint.

A cDNS szintézishez a Fermentas Reverz Transcriptáz (RevertAid™ H Minus M-MuLV)- kitjét használtuk, a FERMENTAS cég által javasolt előírások szerint, a következőképpen: 1 µg DNáz kezelt összRNS; 50 µM random hexamer 2,5 µl; dH₂O X µl - reakcióelegyet készítettünk. (X mennyisége az összRNS mennyiségétől függ, a reakcióelegy 25 µl végtérfogatának megfelelően.) Ezt 70 °C-on inkubáltuk 5 percig, majd jégen 5 percig állni hagytuk. Ezt követően kiegészítettük a reakcióelegyet a következő oldatokkal: 5x reverz transcriptáz puffer 10 µl; 10 mM dNTPs 5 µl; Inhibitor 0.5 µl; dH₂O 9.5 µl. Majd 25 °C-on inkubáltuk 5 percig, és hozzáadtunk 1 µl enzimet a reakcióelegyhez, amit a továbbiakban 25 °C-on 10 percig, majd 42 °C-on 1 óráig és 70 °C-on 10 percig kezeltünk. A cDNS szintézis eredményességét PCR reakcióval ellenőriztük.

IV.14. Kvantitatív RT-PCR

A vizsgált gének kifejeződését kvantitatív RT-PCR technikával vizsgáltuk. A kiválasztott génekre specifikus oligókat az Applied Biosystems Primer Express software-vel terveztük, a primer-szekvenciákat táblázatban foglaltuk össze (lásd. Függelék). A szinjetizált cDNS-eket 1:3,5 arányban hígítottuk nukleáz mentes vízzel. A reakcióelegy 20 µl végtérfogat volt, amiben az egyes oligók 150 µM végkoncentrációban voltak jelen, valamint a 9 µl a hígított cDNS-ből és 10 µl a 2x SYBR Green PCR Master Mix-ből (APPLIED BIOSYSTEMS). A kvantitatív PCR-t az ABI Prism 7000 Sequence Detection System készülékkel végeztük, az ajánlott paramétereket követve. Így 10 perc 95°C fokon, majd 45x ismétlésben 95°C-on 15 sec és 60°C-on 1 perc. A PCR futását követően az ABI Prism Dissociation Curve Analysis Software alkalmazásával a termék specifikusságát is megvizsgáltuk. Az adatok analíziséhez a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittegen, 2001).

IV.15. *In vitro* RNS transzkripció

A tisztított plazmid DNS-eket a megfelelő restrikciós enzimmel (*Sma*I) hasítottuk, majd a linearizált DNS-t fenollal, fenol-kloroformmal és kloroformmal extraháltuk, etanollal kicsaptuk, majd centrifugálás és szárítás után steril desztillált vízben feloldottuk. A szokásos 100 µl-es transzkripciós reakcióelegy tartalmazott 2-3 µg linearizált templátot, 500 mM ATP-t, CTP-t, UTP-t és GTP-t, 100 unit RNasin®-t (Promega), 10 mM dithiothreitol, 6 mM magnézium-kloridot, 4mM spermidint, 40 mM Tris-HCl-t (pH 7,2) és 100 unit T7 RNS-polimerázt (Promega). A reakcióelegyet egy órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd 1,2 %-os agaróz gélen elválasztottuk, és etidium-bromiddal megfestve ellenőriztük a transzkriptumok minőségét.

IV.16. *In situ* hibridizáció

Az *RBR* RNS-ek növényi szövetekben való kimutatására *in situ* hibridizációs módszert alkalmaztunk. Rizs csíranövényeket ágyasztunk be levél- és gyökérkeresztmetszetek készítéséhez. A szövetek fixálását 4% formaldehid oldatban végeztük jégben, majd 4 °C-on történt etanolos dehidratálás után fokozatosan Roti®-Histol (Roth) oldatba helyeztük a mintákat szobahőmérsékleten. A szövetek megfestése után (Eosin yellowish, Fluka) paraffin darabkákat (Paraffin embedding media, Sigma) adtunk a szövetekhez szobahőmérsékleten, telítésig. Ezt a műveletet folytattuk 42 °C-on. Ezután olvadt paraffint cseréltünk a mintákon 56 °C-on 3-5 napon keresztül napi három alkalommal. A mintákat orientálás után paraffinba dermesztettük, majd 10 µm vastagságú keresztmetszetek készültek a szövetekből. *In situ* hibridizációhoz negatív szálú digoxigenin-11-UTP-vel (Roche) jelölt rizs *RBR*-ékre specifikus RNS-t használtunk, amely a rizs *RBR* specifikus régiójáról szintetizáltunk a gyártó javaslata szerint. Ezek a próbák csak az egyedi *RBR* mRNS-t ismerik fel, mivel nem tartalmaznak konzervált szekvenciát. A jelölt RNS-eket alkalikus-foszfáttal konjugált antidigoxigenin antitesttel mutattuk ki (Havelda és Maule, 2000).

IV.17. Élesztő két-hibrid mátrix analízis

A fehérjekölcsönhatások vizsgálatához Schiestl és Gietz (1989) által kidolgozott élesztő két-hibrid módszert alkalmaztuk. A kísérletek alapjául szolgált a pGBT9 (Clontech), pBD-GAL4 2.1, és pAD-GAL4 2.1 vektorok (Stratagene). Az élesztő két-hibrid vizsgálatokhoz a következő vektorokat készítettük el, mint “bait” pGBT9/*MsRBRA;1*, pBD-GAL4 2.1/*OsRBRB;1* és pBD-GAL4 2.1/*OsRBRC;1*, valamint mint “prey” pAD-GAL4 2.1/*MSV RepA*, pAD-GAL4 2.1/*OsRBRI2*, pAD-GAL4 2.1/*OsRBRI5*, pAD-GAL4 2.1/*Medtr;CycD5*, pAD-GAL4 2.1/*MsPP2AregB*. Kísérleteinkben *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a (James et al., 1996) élesztőgomba törzsbe jutattuk be az említett vektorokat. A vektorokat tartalmazó transzformánsok - Trp, -Leu, -His, -Ade táptalajon növesztettük és a HIS3 and ADE2 riportergének aktiválódását vizsgáltuk (Sambrook és mts., 1989). A fehérje kölcsönhatások mennyiségi meghatározásához az ONPG módszert alkalmaztuk és a Relatív β -galaktozidáz egységeket Horváth és mts. (1998) munkája alapján határoztuk meg.

V. EREDMÉNYEK

V.1. Szinkronizációs kísérletek

Szinkronizációs kísérleteinkhez Unggi9 és Taipei-309 fajta rizs sejtszuspenziókat használtunk. A rizs sejt kultúrákat 2mg/L 2,4-D-vel kiegészített AA, illetve G1 tápoldatban tenyésztettük, a tápoldat heti frissítésével, hogy jól osztódó-finom sejt populációt neveljünk. Ezen sejt kultúrákat alkalmaztuk a továbbiakban a sejt ciklus szinkronizációs paraméterek optimalizálásához. A sejtek szinkronizálásához megvizsgáltuk, milyen blokkoló anyagok alkalmazása a legideálisabb, hogy a blokkolást követően a sejtosztódás reaktiválódjon, figyelembe véve a blokkoló anyag koncentrációját és a kezelés időtartamát is. Előkísérleteink során mimosine-t, propizamide-ot, aphidicolint és hidroxürea-t használtunk különböző koncentrációban, 24 órás és 36 órás inkubációs idővel, az eddig ismert irodalmi adatokra alapozva. A kezeléseket során a blokkoló anyag koncentrációja és annak a rendszerből mosásokkal való eltávolítása a legkritikusabb pontjai a folyamatnak.

A mimosine olyan blokkoló anyag, amit eddig csak emlős sejt vonalak szinkronizálásához használtak. Ezért megvizsgáltuk, hogy milyen hatással lesz a növényi kultúrákra, esetünkben a rizs szuspenziókra. Kísérleteinkben a 100 és 200 mM koncentrációt választottuk, az emlős sejt kultúrákon végzett optimalizálási vizsgálatokra alapozva. Érdekes módon a kezelés hatására a sejt kultúrák elszíneződtek, ami jelentheti, hogy a blokkoló anyag reagált a tápoldat valamely komponensével, így megváltoztatva annak pH értékét. Ahhoz, hogy valószínűleg használható legyen ez a blokkoló anyag további kísérletek elvégzése szükséges.

Propizamide kezelés során az áramlásos citometriai vizsgálataink nem mutattak hatékony blokkolást. A kezelési koncentráció további optimalizálását követően valószínűleg ez a blokkoló anyag is használható lesz majd a sejt ciklus tanulmányozására.

A lúdfű szinkronizációs kísérleteknél jól bevált aphidicolint is kiprobáltuk. Ebben az esetben az alkalmazott koncentrációk vagy a blokkolás nem volt megfelelő vagy a sejt ciklus nem reaktiválódott, ami a blokkoló anyag toxikus hatására utal, ha a

sejtek közül nem tudjuk megfelelően eltávolítani. Ezen blokkoló anyag jövőbeni alkalmazása is további kísérleteket igényel.

Kísérleteink alapján a hidroxürea kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak, még pedig a sejt kultúrák a hidroxürea 10 mM koncentrációban való alkalmazása 24 órás időtartam alatt, így ezt a kezelési körülményt használtuk a továbbiakban.

A szinkronizációs kísérletet a passzálást követő második napon indítottuk, amikor a sejtek újra aktívan osztódtak a táptalaj frissítést követően. Ezt előzetesen a sejt kultúra osztódásának jellemzésével határoztuk meg. A tápoldat frissítést követően a szuszpenziók pH-ja lecsökken és a sejtek nagy része stationer fázisban van. Az általunk használt kultúráknál a passzálást követő 2. napon indult újra az osztódás. A hidroxürea-s blokkolást követően kondicionált médiumot, ami nem kezelt párhuzamos sejtenyészetek szűrt tápoldata, használtunk a blokkoló anyag eltávolításához (3 x 20 perc), majd a sejteket azonos kiindulási térfogatú kondicionáló tápfolyadékban inkubáltuk. A kísérlet során 3 órás időközönként vettünk mintát sejtmagizoláláshoz, a DNS tartalom változásának vizsgálatához és génexpressziós analízishez.

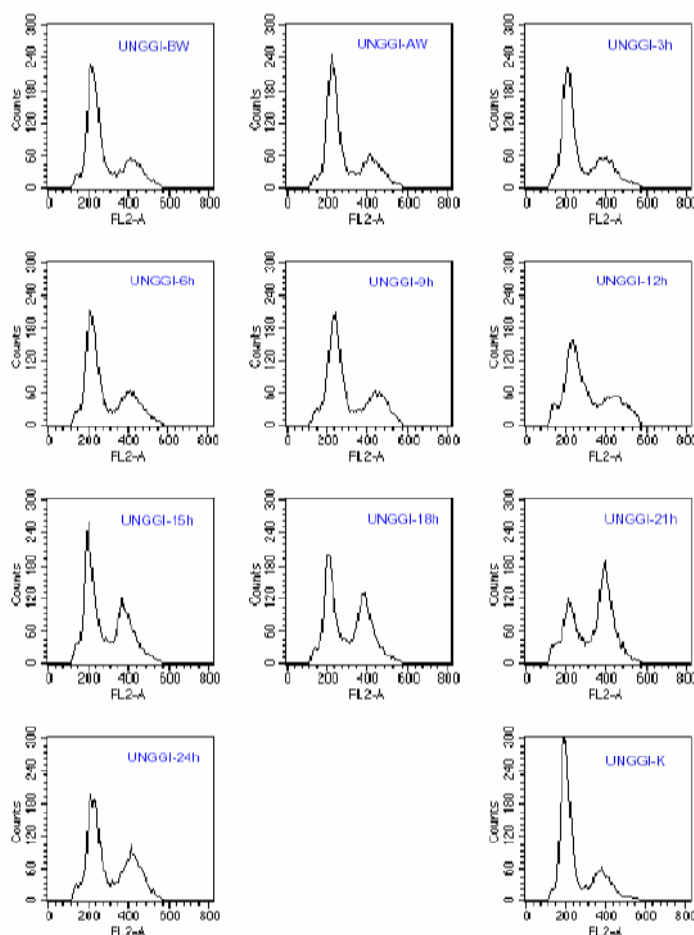
V.1.1. Az Unggi9 sejt kultúra szinkronizációs kísérlete

A 2. ábrán az Unggi9 sejtsuszpenzió szinkronizációs kísérlete során három óránként vett minták áramlási citometriás analízisének hisztogramjai láthatók. Az x-tengelyen a fluoreszcencia intenzitást, vagyis a relatív DNS tartalmat, az y-tengelyen a mért sejtmagok számát ábrázoltuk. A hisztogramokon látható görbék első csúcsa a G1 fázisban lévő sejteket mutatja, a második csúcs a G2 fázisban levőket, míg az S fázisban lévő sejtek DNS-tartalmuk alapján a két csúcs közötti szakaszra esnek, arányukat ebből kalkulálják a szoftverek. Az utolsó hisztogramon a kontroll minta látható, amelyről leolvasható, hogy a sejtek túlnyomó többsége G1 fázisban van mindenféle kezelés nélkül. A 2. ábrán látható, hogy a hidroxürea eltávolítása után 12 órával megnövekedett az S fázisban lévő sejtek aránya, majd a mosást követő 15. órában a G2 fázis növekedése is megindult. A 21 órás mintavételnél szembetűnő változás következett be, a sejtek többsége G2 fázisban volt.

Ezen adatok alapján elmondhatjuk, hogy CellQuest programmal végzett analízisek szerint látható, hogy az általunk várt változások bekövetkeztek, a sejtek

többsége a 21. órán G2 fázisban volt, ami a szinkronizációs kísérlet sikerességét igazolja. A továbbiakban ezen mérési adatokat értékeltük ModFit LT 2.0 szoftverrel.

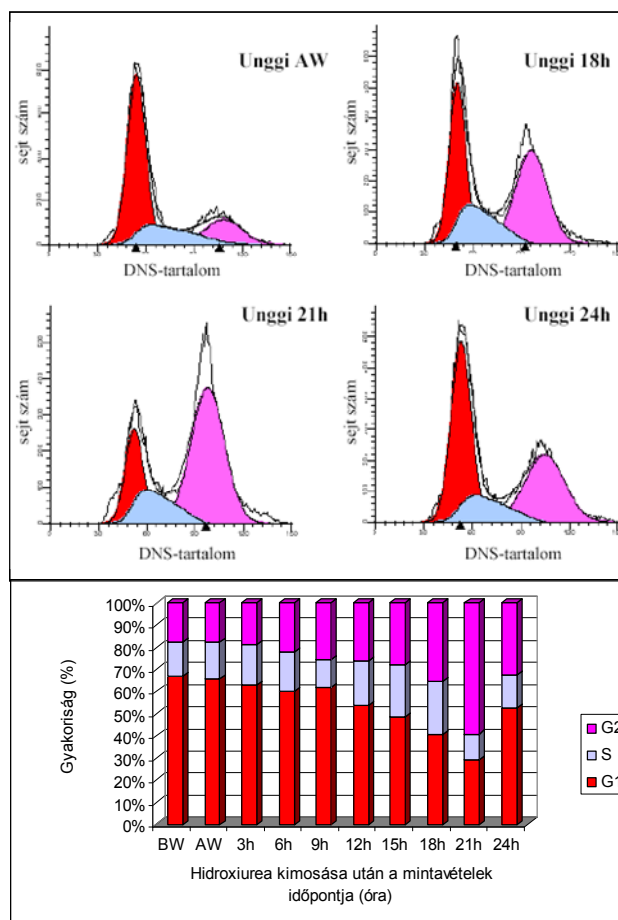
A 3. ábrán kiemeltük a hidroxürea eltávolítása után közvetlenül vett mintát (AW= after wash), és a 18., 21. és 24. órán vett mintákat. Szinkronizációs kísérleteink során az AW minta szolgáltatja a viszonyítási alapot. A további két mintának (18. és 21. óránál) azért van kiemelt szerepe, mert ezekben az időpontokban következett be a legnagyobb változás az S és a G2 fázisokban. A 24. órás minta szemlélteti, hogy a sejtek átmentek a mitózis folyamatán, túlnyomó többségük ismét G1 fázisba került. A ModFit LT 2.0 szoftver által végzett értékelés által százalékos értékekben adtuk meg a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek számát-gyakoriságát.



2. ábra. Az Unggi9 sejtszuspenzió szinkronizációs kísérlete során három óránként vett minták áramlási citometriai mérésének hisztogramjai.

Ezen értékek szerint, a kontroll (nem kezelt) sejtszuspenzió esetén a sejtek túlnyomó többsége, 70,24 %-a G1, 15,87 %-a pedig S-fázisban volt. Az általunk alkalmazott hidroxürea (HU) blokkoló anyag a sejteket G1, és S fázisban blokkolta,

majd a HU kimosását követően a G1 fázisban lévő sejtek aránya 65,86 %, az S fázisos sejtek aránya 16,32 % volt. A blokkoló ágens eltávolítása után 15 órával már csökkenés mutatkozott a G1 fázisban lévő sejtek arányában, amely 48,76 % volt, és az S fázis is növekedett 23,34 %-ra, míg a G2 fázisban lévő sejtek aránya 27,90 %-ra emelkedett. A 21 óránál a sejtek 59,19 %-a G2 fázisban, majd valószínűleg mitózisba léptek. A G1 fázis pedig lecsökkent 28,99 %-ra. 24 óra elteltével a G1 sejtek aránya ismét növekedett, 52,36 %-ra, ami a mitózis befejeztére utal.



3. ábra. Hidroxiurea kezeléssel szinkronizált Unggi9 sejtuszuspenzió mosást követő (AW), 18, 21, 24 órás mintavételeinek ModFit LT. 2.0 szoftverrel készült analízise. A hidroxiurea kezeléssel szinkronozált Unggi9 sejtek sejtciklus fázisok szerinti megoszlása.

Méréseink alapján megállapíthatjuk, hogy az Unggi9 sejtenyészetek hidroxiurea kezelésével jó részleges szinkronizációt értünk el, mivel a 21. órás minta estében a G2 populáció túlnyomó többségben volt a G1 populációhoz képest. Természetesen egy teljes sejtszinkronizációhoz további kísérletek szükségesek, kiemelten az aphidicolinnal végzett blokkolás pontos optimalizálása tűnik nagyon ígéretesnek.

V.1.2. A Taipei-309 sejtkultúra szinkronizációs kísérletek

A Taipei-309 sejtkultúra blokkolását 10 mM hidroxürea kezeléssel végeztük 24 óráig. Ezt követően eltávolítottuk a blokkoló anyagot, és minden harmadik órában mintát vételeztünk áramlásos citometriai méréshez, valamint sejtciklus függő gének RNS szintjének detektálásához. Az egyes minták áramlásos citometriai vizsgálatából kapott eredményeket a 4. ábrán mutatjuk be. A T-309 Kontroll minta mutatja egy nem kezelt sejtkultúrában a G1 és G2 fázisokban lévő sejtek eloszlását (4. ábra, T-309K). Kísérletünkben a Taipei-309 sejtkultúra blokkolását a BW, mosás előtti és AW, mosás után minták mutatják, melyek szerint a blokkoló anyag közepes mértékben

állította meg a sejteket.

Erre a meglévő G2-es populációból

következtethetünk.

A hidroxürea eltávolítása

sikeres volt, mivel már a 3.

óránál vett mintákon is kis

eltérés megfigyelhető (4.

ábra). A sejtek osztódásba

visszatérését a további

citometriai mintákon jól

látható, mivel az S fázisnak

tekinthető rész és a G2

populáció is növekszik a

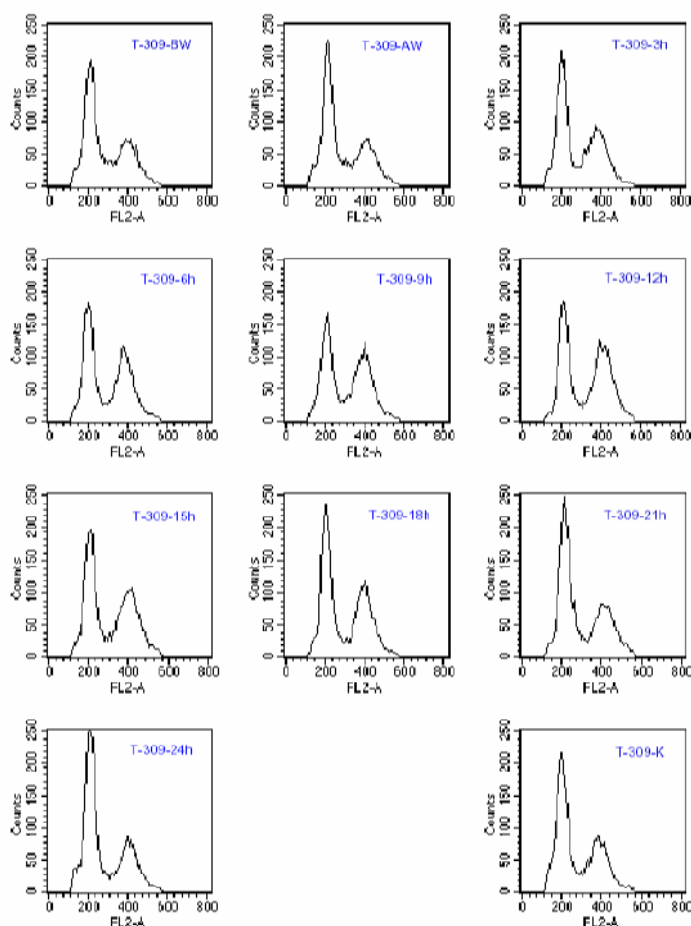
G1 csúchoz képest (lásd

9-12 h minták). A mérések

alapján feltételezzük, hogy

a mitózis valahol a 12. és

15. óra között lehetett, ezt

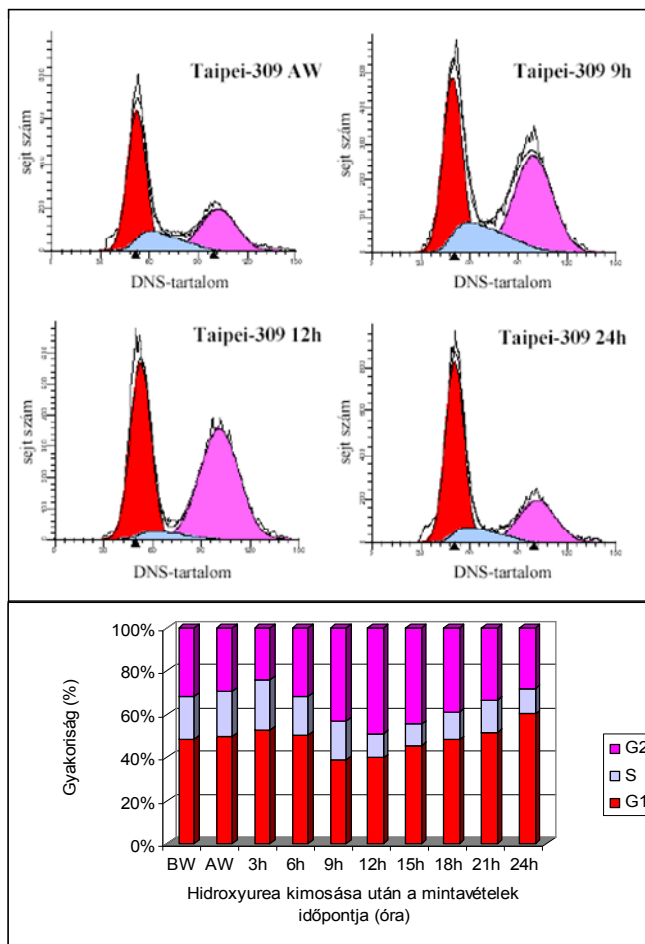


követően a sejtek többsége újra G0/G1 fázisba kerül.

4. ábra. A Taipei-309 sejtkultúra szinkronizációs kísérletének áramlásos citometria mérései.

A mérést követően a Taipei-309 sejtszuspenziós mintákon is elvégeztük az adatok számszerű értékelését a ModFit LT 2.0 szoftver segítségével. Ezen esetben is a

hydroxyurea eltávolítása után vett minta nyújtotta a viszonyítási alapot, de itt a változás, már a 9.-12. órában jelentős volt, ezért ezeket az ábrákat emeltük ki. A sejtek többsége a mosást követő 21. órában már ismét G1 fázisban volt, azaz egy cikluson keresztül haladtak.



5. ábra. Hidroxiurea kezeléssel szinkronizált Taipei-309 sejttenyészet mosást követő (AW), 9, 12, 21 órás mintavételeinek ModFit LT. 2.0 szoftveres értékelése. A szinkronizált Taipei-309 rizs sejtek sejtciklus szerinti megoszlása.

A ModFit analízisből kapott értékek alapján megállapíthatjuk, hogy a blokkolás részleges volt, mert a sejtek 30 %-a G2 fázisban maradt, aminek egyik oka lehet, hogy a mitózis előtt vagy benne levő sejtek megrekedtek, valószínűleg elpusztulhattak a blokkolás során. A számszerű adatok szerint a G1 és S fázisban levő sejtek többsége a blokkolást követő 6 óráig voltak abban az állapotban, melyet a hydroxyurea kezeléssel elértünk. A 9. óránál viszont a sejtek tovább folytatták a sejtciklust és a G2 fázisban lévő sejtek száma egyre növekedett egészen a mosást követő 15 óráig. Valahol ezen időpont környékén következett be a sejtek többségének mitózisa, majd ezután átléptek a sejtek újra G1 fázisba a következő osztódási folyamat beindulásáig. A 5. ábrán szemléltetjük kísérletünk számszerű adatait, ami

alapján láthatjuk az egyes fázisok növekedését-csökkenését. Ez a hullámvázis jól szemlélteti a sejtek különböző sejtciklus fázisban levő megoszlásait, a szinkronizált sejtek megoszlását.

A Taipei-309 sejttenyészetben végzett szinkronizációs kísérletről megállapíthatjuk, hogy a sejtek többsége a blokkoló anyag hatására G1 és S fázisban megállt, majd a hidroxürea eltávolítását követően G2 fázisba léptek és a mitózison is keresztül mentek, és újra visszatértek G1 “kiindulási” fázisba. A jövőbeni kísérleteknek arra kell irányulniuk, hogy a blokkolás még hatékonyabb legyen, azaz a blokkoló anyaggal való kezelés további optimalizálásával a módszer még hatékonyabb legyen. A szinkronizáció sikerességét a kísérlet során vett folyékony nitrogénben lefagyasztott minták feltárással és ezeken végzett molekuláris vizsgálatokkal kívántuk bővebben bizonyítani.

V.1.3. A szinkronizáció hatékonyságának ellenőrzése sejtciklus függő gének expressziós szintjének vizsgálatával

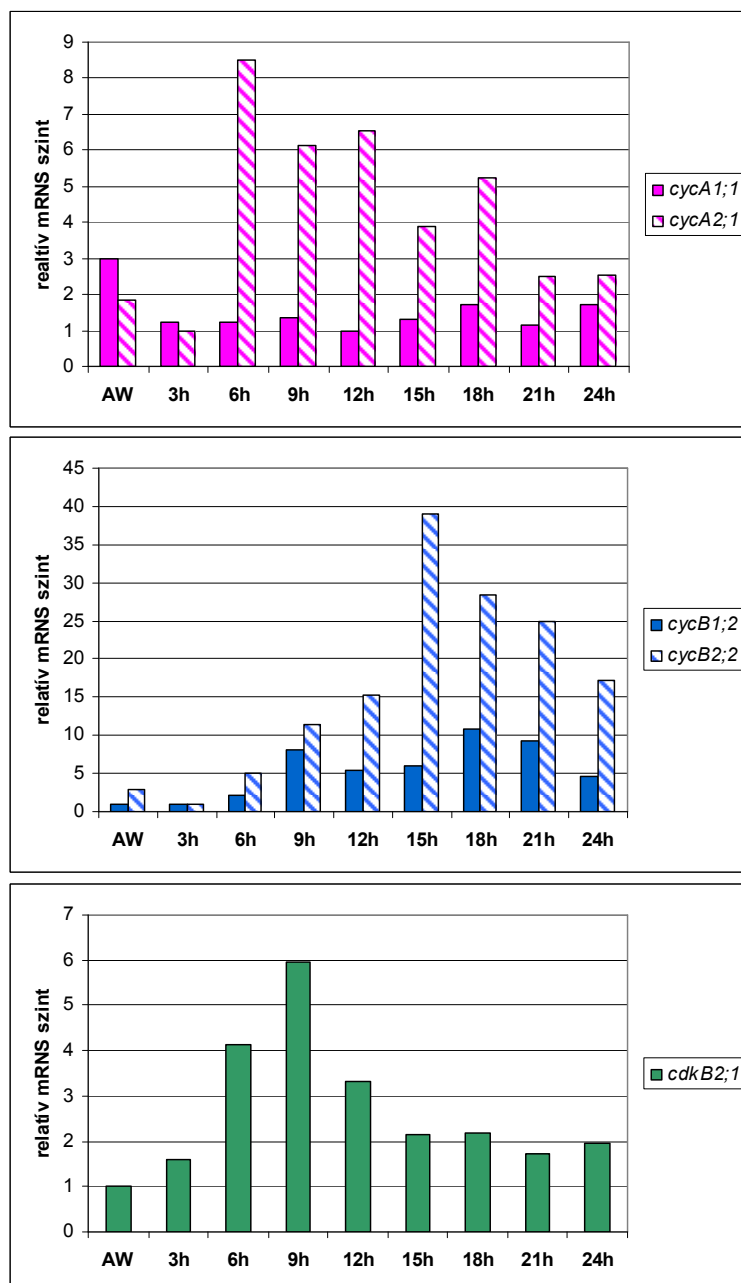
A legtöbb sejtciklust szabályozó gén kifejeződése konzervált az eddig tanulmányozott különböző élőlényekben, élesztőtől az emberig, beleértve a magasabbrendű növényeket is. A sejtciklus lépéseit ciklinek és ciklin függő kinázok határozzák meg, melyek az osztódás során betöltött szerepük szerint csoportosíthatók, ami visszavezethető ezen gének sejtciklus függő kifejeződésére. Ismert, hogy az A-típusú ciklin gének a sejtciklus korai fázisában fejeződnek ki, míg a B-típusú ciklineket kódoló gének magas expresszióját a G2/M fázisok közötti átmenetben detektálták.

A kiválasztott sejtciklus függő gének expressziójára irányuló vizsgálataink eredményeit a 6. ábra szemlélteti. Kvantitatív RT-PCR technika alkalmazásával kimutattuk, hogy a *CYCA1;1* gén a szinkronizált rizs sejtekben konstitutívan fejeződik ki a sejtciklus folyamán, ami összhangban van a más élőlényekben már korábban kimutatott eredményekkel. A *CYCA2;1* gén mRNS szintjét vizsgálva, az A-típusú ciklinekre jellemző S fázistól mitózissig tartó magas génkifejeződést detektáltunk, ami igazán jellemző ezen ciklinekre és alátámasztja ezen gének sejtciklus függő szabályozó szerepét egyszikű növényekben is. A B-típusú ciklinek közül kísérleteinkben a *CYCB1;2* és a *CYCB2;2* gének expresszióját vizsgáltuk szinkronizált mintáinkon (lásd. 6. ábra). A grafikon szemlélteti, hogy a *CYCB2;2* gén

kifejeződése, a B-típusú ciklinekre jellemzően, a G2/M átmenetnél emelkedett meg igazán, ami összhangban van azzal, hogy a sejtosztódás folyamatának ezen pontjában szabályozó szerepük van.

A sejtciklus fontos reguláló egységei között kiemelt szerepe van a ciklinfüggő -kinázoknak. Egyes B-típusú *CDK* gének expressziójáról ismert, hogy a G2 és M fázisban nagyon magas, ezért az általunk elvégzett kísérletben is vizsgáltuk a *CDKB2;1* gén transzkriptumának felhalmozódását. A 6. ábrán látható, hogy a *CDKB2;1* génről képződött RNS mennyisége a 6-9 órás mintákban megnőtt, ahol az S fázis végét és a G2 fázis kezdetét detektáltuk áramlásos citométerrel.

Az elvégzett kvantitatív RT-PCR kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a hidroxüreával végzett szinkronizációja a Taipei-309 sejtenyészetnek sikeres volt, amit az általunk vizsgált gének relatív mRNS szintjeinek változásai is alátámasztottak. Természetesen egy ennél nagyobb hatékonyságú szinkronizációs rendszerhez még további optimalizációs kísérletek szükségesek.



6. ábra. A rizs *cycA1;1*, *cycA2;1*, *cycB1;2*, *cycB2;2* és a *cdkB2;1* gének relatív mRNS szintjeinek változása a rizs Taipei-309 sejtvonalon végzett szinkronizációs kísérlet során. A vizsgált gének relatív transzkript szintjét kvantitatív RT-PCR technikával határoztuk meg és a konstitutív aktin gén kifejeződéséhez viszonyítottuk.

V.2. Növényi CDK kinázok szerepe a növényi fejlődés során

A CDK fehérjék az elsődleges szabályozó egységei a sejtciklusnak. A CDK kinázok túlermelletésével feltételezhető a sejtciklus felgyorsítása növényekben. A CDK kinázok növényi fejlődésben betöltött szerepének tanulmányozására túlermelő transzformáns növényeket hoztunk létre. A fehérjék túlermelletésére a hiszton 3.2 konstitutív promóterét használtuk, amelyről korábbiakban bemutatták, hogy jól használható egyszikű növényekben, így rizs esetén is. Vizsgálatainkban a korábban már ismert *Cdc2MsA/Medsa;CDKA1;1*, *Cdc2MsD/Medsa;CDKB1;1* és *Cdc2MsF/Medsa;CDKB2;1* *Medicago sativa*-ból izolált CDK kinázokat kódoló géneket használtuk fel kísérleteinkben, feltételezve a viszonylagosan magas homológiát. Ezen CDK kinázok vizsgálatára a következő plazmidokat hoztuk létre: pCHD2A, pCHD2D, illetve pCHD2F (lásd, Anyagok és Módszerek), amelyekben a vizsgálandó gének kifejeződése a hiszton 3.2 promótere által irányított. A konstrukcióban megtalálható herbicid (foszfínotricin, PPT) gén biztosította rezisztenciára alapozva szelektáltuk ki a transzformáns vonalakat. 10 (pCHD2A), 8 (pCHD2D), 12 (pCHD2F) független transzgénikus vonalakat hoztunk létre *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette génbeviteli módszerrel (Hiei és mts. 1994).

Minden egyedi vonal esetében a transzgén genomba épülését Southern analízissel vizsgáltunk meg (nem közölt eredmény). A transzgén példányszámát és beépülését vizsgálva megállapítottuk, hogy minden egyes vonal egyedi és független egymástól, azaz a beépülés különböző helyen történt a rizs genomba, illetve egy vagy két kópiában található meg a genomba integrálódott transzgént. A transzformáns növények PPT-re rezisztensek voltak, ami az mutatja, hogy a konstrukcióban lévő gén aktív volt, mindhárom vektor esetében. A transzformáció sikerességét a plazmidokba beépített riportergén konstrukcióval vizsgáltuk elsőként. A transzformáns növényekből származó levél mintákból izolált genomi DNS-en PCR technika alkalmazásával mutattuk ki a túlermelendő gének jelenlétét, az egyes génekre egyedi-specifikus oligonukleotidok segítségével (lásd. az egyes fejezet részekben: 8., 10., 12. ábra). Mindhárom CDK gén kifejeződését fehérje szinten Western analízissel detektáltuk. Az „idegen” fehérjék magas szinten halmozódtak fel a növények különböző szerveiben, mind hajtásban, mind pedig a gyökérben. (lásd. az egyes fejezet részekben: 8., 10., 12. ábra)

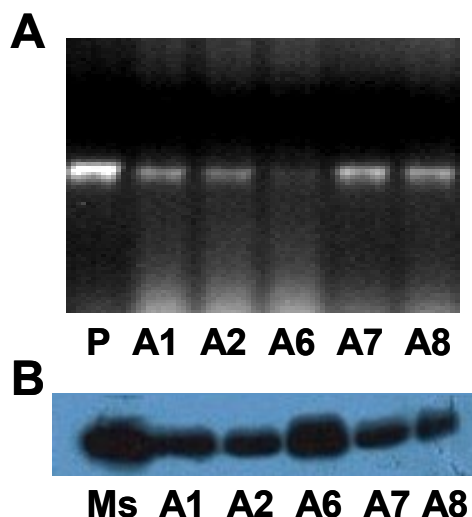
Mindhárom konstrukció esetében 5-5 független vonalat választottunk ki további vizsgálatainkhoz, amelyek konstitutívan túltermelték a *Medsa;CDKA1;1*, *Medsa;CDKB1;1*, illetve a *Medsa;CDKB2;1* géneket. Ezen vonalak esetében vizsgáltuk a növények fejlődési ütemét és a fehérjék túltermeltetésének a növények fenotípusára gyakorolt hatását (7. ábra).



Taipei Medsa;
CDKA1;1 Medsa;
CDKB1;1 Medsa;
CDKB2;1

7. ábra. CDK kinázokat túltermelő transzgénikus növények. Balról-jobbra: Taipei-309 módosítatlan kontroll növények, Medsa;CDKA1;1 fehérjét túltermelő növények, MedsaCDKB1;1 fehérjét túltermelő növények, MedsaCDKB2;1 fehérjét túltermelő növények az üvegházban.

V.2.1. A *Medsa;CDKA1;1* kináz kifejeztetése transzformáns növényekben

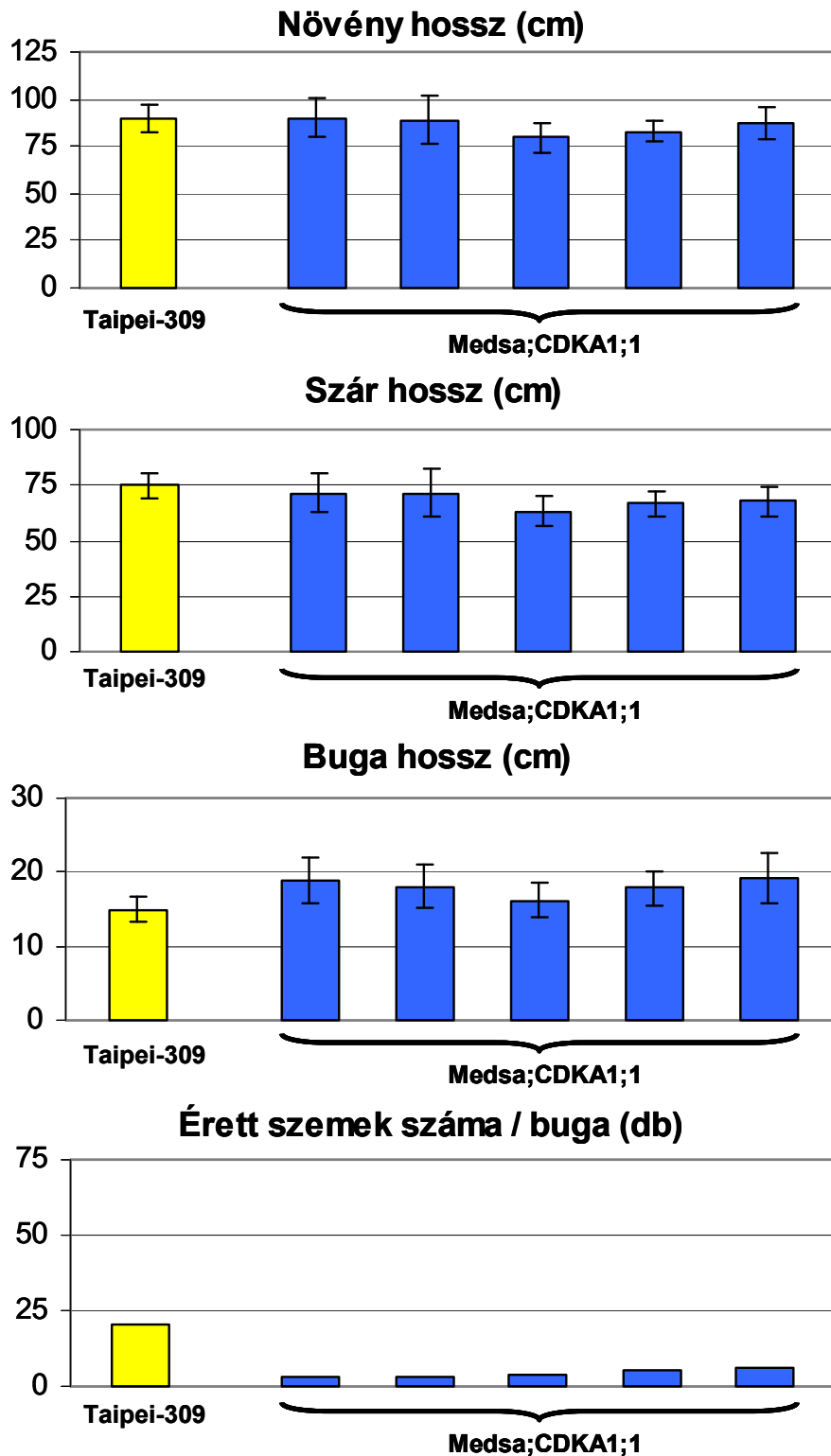


8. ábra. A transzgén jelenlétének bizonyítása PCR technikával (A) és a *CDKA1;1* kináz fehérje túlermelletésének bemutatása Western analízissel (B). P: plazmid, Ms: *Medicago sativa* A2 sejtekből izolált összfehérje, A1-A8 transzgénikus növényi vonalak.

A pCHD2A vektort tartalmazó és a *Medsa;CDKA1;1* kinázt túlermelő transzformáns növények esetében a következő méret felvételeket tettük meg (lásd. 9.ábra). A vegetatív részek fenotípusában nem tapasztaltunk jelentős különbséget összehasonlítva a nem transzformáns kontroll növények méreteivel. Azaz a növények teljes hossza átlagosan a 68 ± 2 cm volt, ami a kontroll növényekkel összehasonlítva nem haladta meg az 5%-os különbséget. A bugák átlagos hossza 18 ± 0.5 cm volt, ami plusz 20%-os növekedést mutatott. A *Medsa;CDKA1;1* gént kifejező

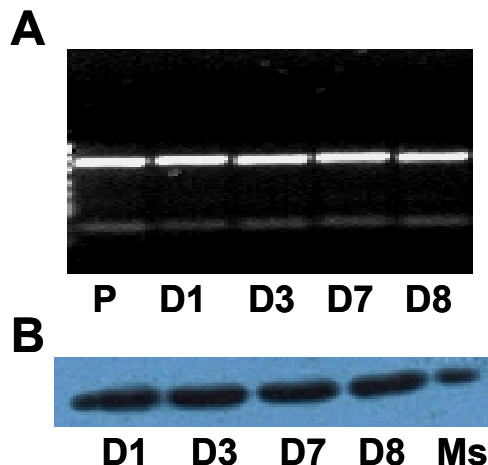
transzgénikus növények mindegyike esetében a szaporító képletekben figyeltünk meg változást. A transzgénikus vonalak átlagosan 75 ± 10 darab pelyva alakult ki normálisnak tűnő generatív szervekkel. A fejlődés során a generatív szervekben a bibe és a porzó esetén külső fenotípusos változást nem észleltünk. Ezen transzgénikus növények végleges kifejlett érett szemtermése ugyanakkor csak 3 ± 1 darab volt, így a bugában meglévő szemekből mindössze 4% vált éretté. Az a néhány szem, amely képződött, mind méretben mind pedig tömegben hasonló volt a nem módosított kontroll növényeken képződött szemekhez, ugyanakkor kivétel nélkül sterilek voltak. Így utódszemek hiányában további transzformációs generációkat nem tudtunk megvizsgálni.

Ezen megfigyelések azt mutatják, hogy a CDK A-típusú kinázoknak fontos szerepe van a generatív szervek fejlődésében, feltételezhetően a pollenek és a bibék termőképessé válásában, valamint az embriók fejlődésében.



9. ábra. CDKA1;1 kinázt túltermelő transzgénikus növények vizsgált fenotípusos jellemzői. A transzgénikus vonalak fenotípusos vizsgálata az alábbi paraméterek szerint: növényhossz, szárhossz, bugahossz, illetve az érett szemek számának aránya a bugában.

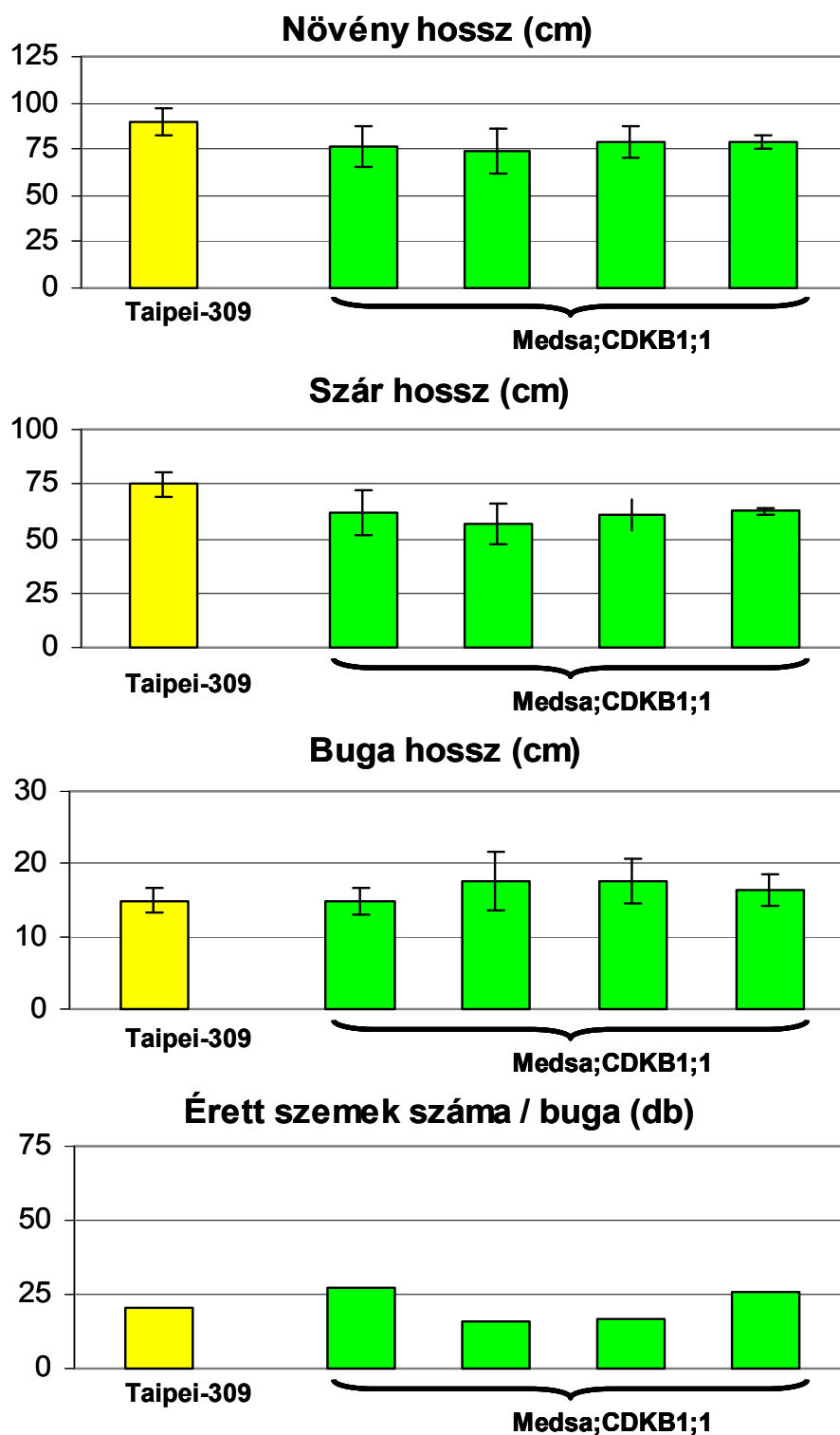
V.2.2. A Medsa;CDKB1;1 túltermeltetésének hatásai rizs növényekben



10. ábra. A transzgén jelenlétének bizonyítása PCR technikával (A) és a CDKB1;1 kináz fehérje túltermeltetésének bemutatása Western analízissel (B). P: plazmid, Ms: Medicago sativa A2 sejtekből izolált összfehérje, D1-D8 transzgénikus növényi vonalak.

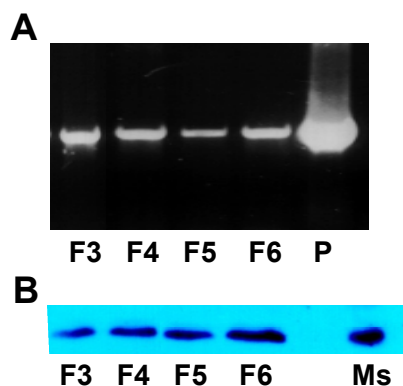
hosszában ilyen különbséget nem tapasztaltunk a nem transzformáns kontroll növényekhez képest. A 7. ábrán jól látható, hogy transzgént túltermelő növények habitusa retardált volt a kontroll növényekhez képest. A Medsa;CDKB1;1 kinázt túltermelő transzgénikus növény fenotípusa jól mutatja, hogy jelentős a zöldtömeg vesztés (habár ezt mérésekkel nem bizonyítottuk), ami gazdasági szempontból nem mellékes. A vegetatív részek kisebbedése ugyanakkor nem befolyásolta a generatív részek fejlődését. Habár kevesebb szem képződött átlagosan (57 szem/ buga), ugyanakkor ezen szemek 37% vált éretté, ami 15% nagyobb mint a vizsgált kontroll növények esetében. A szemek méretében nem tapasztaltunk különbséget, így a továbbiakban a T2 és T3 generációs növényeket tanulmányoztuk. Ezen transzformáns vonalak utód generációi esetén is a növények mérete kisebb volt a kontroll növényekhez képest. A növények növekedési üteme lassabb volt, feltételezhető, hogy a sejtciklus időtartam is megnövekedhetett vagy a sejtosztódások száma csökkent a normális viszonyokhoz képest, habár a generatív részekben nem volt hatással. Ezen megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a CDKB1 kinázok mennyiségének jelenléte a növényi fejlődés és differenciálódás meghatározó eleme.

A B-típusú CDK-nak nagyon fontos szabályozó szerepe van a G2 és az M fázisban. A létrehozott pCHD2D transzgénikus vonalak esetében erőteljes visszamaradást figyeltünk meg a növekedés ütemében. A 11. ábrán is látható, hogy ezen transzgénikus növények sokkal kisebbek, mint a kontroll, vagy bármelyik más transzgénikus vonal. A Medsa;CDKB1;1 kinázt túltermelő növényeknél a növények átlagos hossz mérete $60,5 \pm 2$ cm volt, ami a kontrollhoz képest 20%-os csökkenést mutat. Az egyes pCHD2D vonalak bugájának



11. ábra. CDKB1;1 kinázt túltermelő transzgénikus növények vizsgált fenotípusos jellemzői. A transzgénikus vonalak fenotípusos vizsgálata az alábbi paraméterek szerint: a növényhossz, szárhossz, bugahossz, illetve az érett szemek számának aránya a bugában.

V.2.3. A Medsa;CDKB2;1 kifejeztetésének hatásai rizsnövényekben



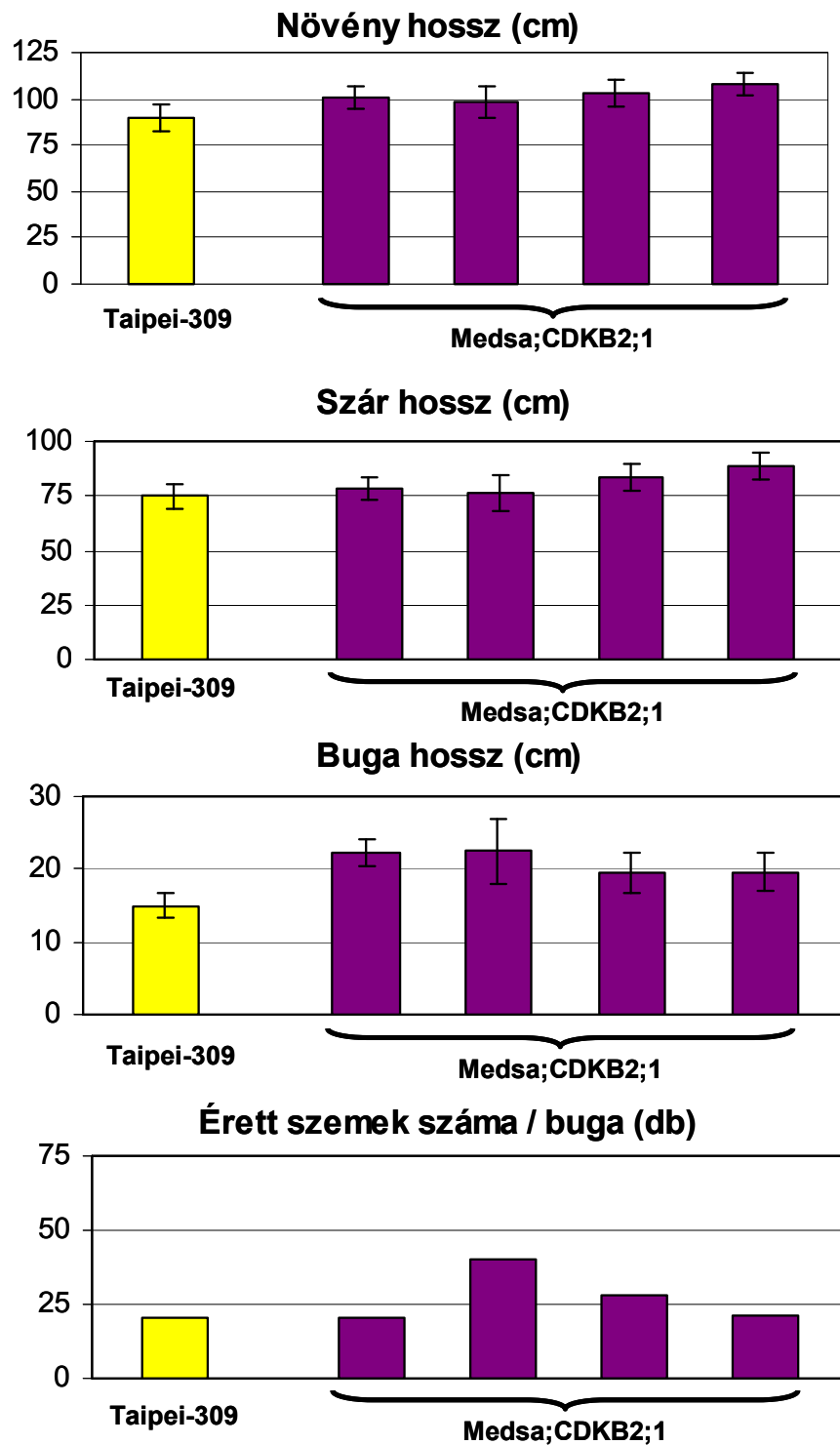
12. ábra. A transzgén jelenlétének bizonyítása PCR technikával (A) és a CDKB2;1 kináz fehérje tútermeltetésének bemutatása Western analízissel (B). P: plazmid, Ms: Medicago sativa A2 sejtekből izolált összfehérje, F3-F6 transzgénikus növényi vonalak.

További munkánk során a Medsa;CDKB2;1 kináz növényfejlődésben betöltött szerepét vizsgáltuk. Medsa;CDKB2;1 túltermelő növényeket hoztunk létre az előzőekhez hasonlóan és a transzgénikus növények fenotípusát, különösen a növekedésüket vizsgáltuk. A Medsa;CDKB2;1 kinázt túltermelő növényeknél nem tapasztaltunk különbséget a rizs szemek számában, méretében, így a T2, illetve T3 generációk fenotípusát is alaposan megvizsgáltuk. Ezen transzgénikus vonalak minden további generációjának (T2 és T3) a növekedési üteme gyorsabb volt, mint a nem transzgénikus kontroll növényeknek. Méréseink szerint minden egyes vonal kb.10%-kal nagyobb növekedési tempóban fejlődött a kontroll növényhez viszonyítva. Ez különösen a csírázást követő időszakban volt jól megfigyelhető majd a fejlődés későbbi szakaszaiban ez 5%-os növekedés különbségre csökkent. A transzformáns növények méretében enyhe növekedést figyelhattunk meg, azaz a növény hossz átlagosan 10% volt nagyobb, mint a kontroll növényeké. Valamint megfigyeltük, hogy a Medsa;CDKB2;1 túltermelő transzgénikus növényi vonalak minden további generációban korábban virágoztak, mint a kontroll növények. A megfigyeléseink szerint a pCHD2F transzgénikus növények a kontroll vonalhoz képest 2 héttel hamarabb hoztak bugát. Emellett a növények habitusa, mint az a 7. ábrán is látható, erősebb, ami zöldsötömeg növekedésre utal.

Mindezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy az osztódás arányában növekedhetett, vagy időtartamában csökkenhetett, ismerve a CDKB2 kinázok sejtciklus szabályozó szerepét. A Medsa;CDKB2;1 kináz kifejeztetésével megfigyelt korábbi virágzás nagyon érdekes biotechnológiai szempontból, és a jövőben fontossá válhat ezen szabályozási folyamat részletes megismerése.

További kísérletek elvégzését nagyon fontosnak találjuk, hogy megismerjük a CDK kinázok szabályozó szerepét, nem csak a sejtosztódásban, hanem a

differentiálódásban, endoreduplikációban és a generatív képletek kialakulásában, fejlődésében is.



13. ábra. CDKB2;1 kinázt túltermelő transzgénikus növények vizsgált fenotípusos jellemzői. A transzgénikus vonalak fenotípusos vizsgálata az alábbi paraméterek szerint: növényhossz, szárhossz, bugahossz, illetve az érett szemek számának aránya a bugában.

V.3. Növényi retinoblasztóma-szerű gének és fehérjék vizsgálata

V.3.1. Retinoblasztóma-szerű gének azonosítása lucernában, rizsben és búzában

A korábbiakban közölt kukorica *RBR* génszekvencia információk alapján oligonukleotidokat terveztünk és számos kombinációban teszteltük azokat, hogy felsokszorozzuk a *Medicago sativa* *RBR* génjét. Az így kapott PCR termék nukleotid sorrendjét meghatároztuk, majd ezt használtuk egy cDNS könyvtár tesztelésére. Ezt a módszert követve sikerült a teljes *MsRBR* cDNS-t izolálni, amely 3559 bp hosszúnak bizonyult és 1025 aminosavból álló 114kDa-os fehérjét kódol (1. táblázat). Az *MsRBR* fehérje meghatározott aminosavsorrendje nagyfokú homológiát mutat az RB fehérjecsalád számos tagjával, főleg az A és B pocket domén részen (lásd 14. ábra).

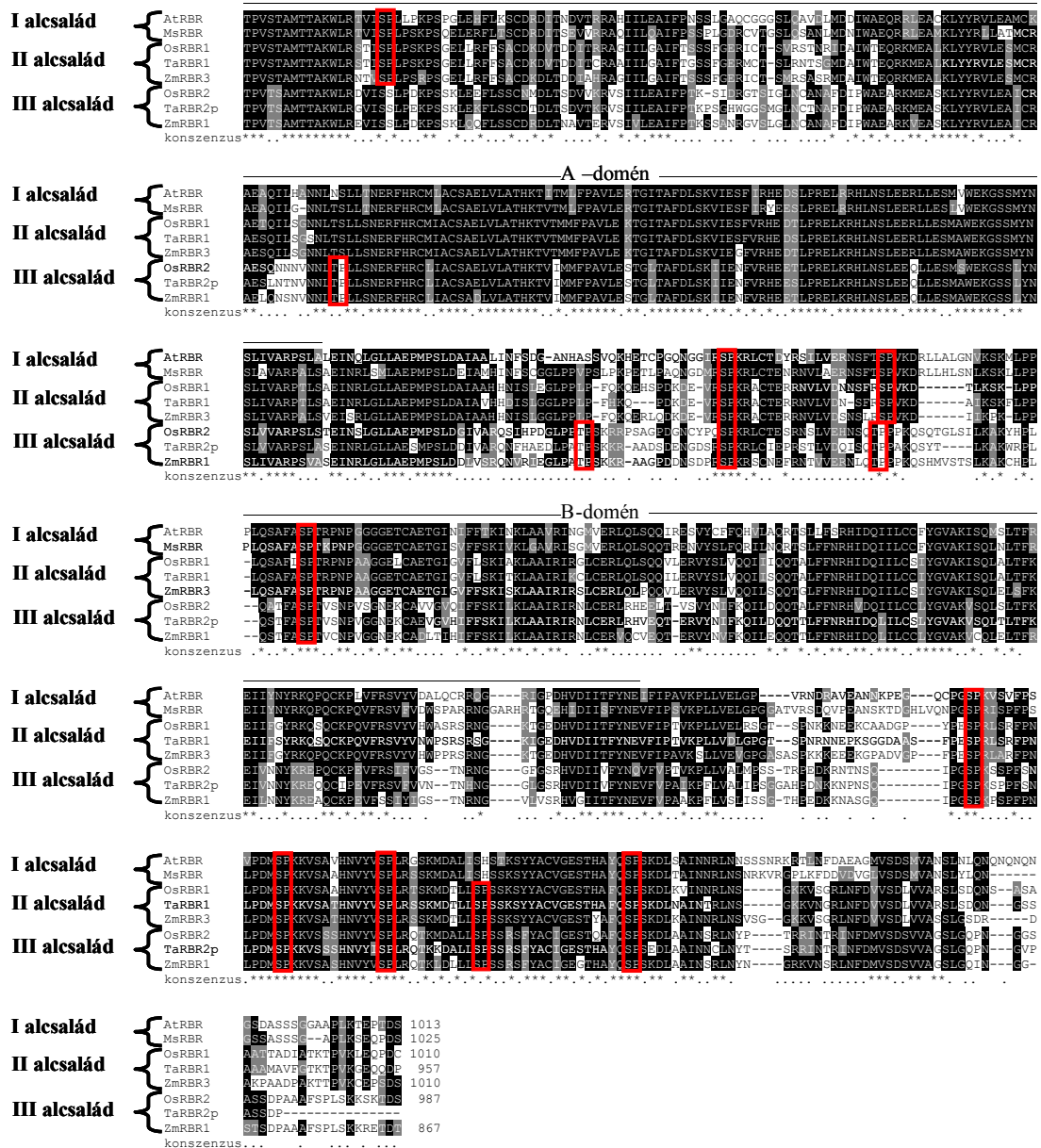
Továbbiakban sikerült két különböző rizs *RBR* gént izolálnunk rizs cDNS könyvtárból a lucerna *MsRBR* gént kódoló régióját használva. A teljes 3498 bp *OsRBR1* nukleotid sorrendjének vizsgálata azt mutatta, hogy a cDNS egy 1010 aminosav hosszú fehérjét kódol amely 111,5 kDa tömegű és izoelektromos pontja 8.65. A cDNS könyvtár további vizsgálata során azonosítottunk egy másik rizs *RBR* variánst az *OsRBR2*-t. Az *OsRBR1* és *OsRBR2* gének nukleinsav sorrendje 60%-os hasonlóságot mutat. A teljes *OsRBR2* cDNS klón 3383 bp hosszúnak bizonyult és egy 978 aminosav hosszú, 107,9 kDa tömegű és 8,10 izoelektromos pontú fehérjét kódol. Az *OsRBR1* és *OsRBR2* fehérjék aminosavsorrendje 52%-os azonosságot és 68%-os homológiát mutat.

A rendelkezésre álló adatbázisokban homológia keresések alapján próbáltunk további egyszikű *RBR* ortológ/homológ fehérjéket és azokat kódoló szekvenciákat meghatározni. A már azonosított rizs *RBR* fehérje homológok szekvenciáit használtuk, mint “alap” tBLASTn keresésekhez a rendelkezésre álló búza EST szekvencia adatbázisokban. A TC szekvenciák részleges nukleotidsorrendjére alapozva határoztuk meg a búza *RBR* géneket a cDNS molekulákon végzett PCR-ekkel és pontos bázissorrend megállapítással. A *TaRBR1* gén majdnem teljes 3436 bp hosszúságú szekvenciája egy 957 aminosavból álló fehérjét kódolhat, míg a *TaRBR2*

részleges 1890 bp hosszúságú cDNS molekuláján egy 598 aminosav nagyságú részleges fehérjét azonosítottunk (1. táblázat). Ezen ismeretek tudatában vizsgáltuk az RBR gének genomiális szerveződését, valamint fehérje szerkezetét.

	Génbank	Fehérje	Fehérje	Molekula	pI
	azonosító szám	azonosító	méret (as)	méret (kDa)	
AtRBR	AF245395	AAF79146.1	1013	112.2	7.8
CrRBR	CRU011681	CAA09736.1	1012	112.9	7.6
CnRBR	AY117036	AAM77469	1011	112.3	8.1
EeRBR	AF230739	AAF34803.1	801	88.7	8.4
MsRBR	AY941773		1025	114.2	7.6
NbRBR	AY699399		1003	111.6	8.1
NtRBR		AAU05979	961	106.6	7.8
OsRBR1	AY941774		1010	111.6	8.6
OsRBR2	AY941775		987	107.9	8.1
PsRBR	AB012024	BAA88690.1	1026	114.5	7.5
PtRBR	AF133675	AAT61377	1035	114.6	8.2
SbRBR	AB205136		1006	111.8	8.3
TaRBR1	AY941772		957	106.1	8.5
TaRBR2	AY941776		598		
ZmRBR1	X98923	CAA67422	867	96.3	7.8
ZmRBR2	AJ279062	CAC82493	866	96.5	7.9
ZmRBR2a	AF007794	AAB69650	420		
ZmRBR2b	AF007795	AAB69651	584		
ZmRBR3	DQ124423	AAZ99092.1	1010	111.4	8.7

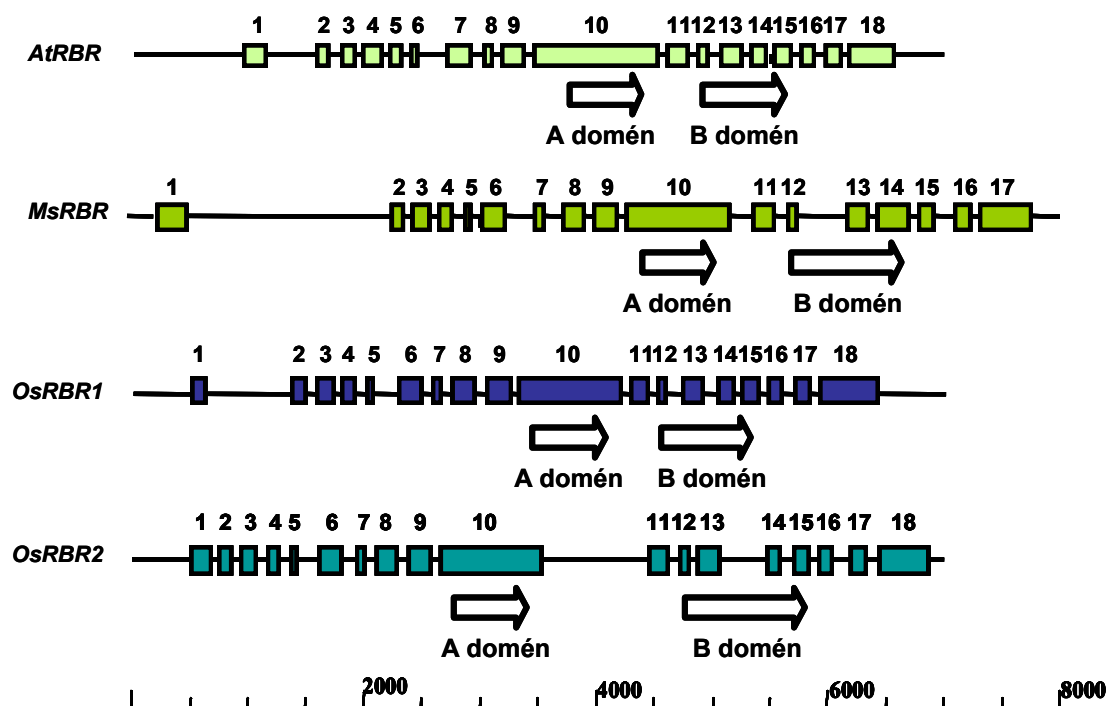
1. táblázat: Génbank azonosító számok és a meghatározott fehérje jellemzők, pI (izoelektromos pont); At, *Arabidopsis thaliana*; Cr, *Chenopodium rubrum*; Cn, *Cocos nucifera*; Ee, *Euphorbia esula*; Ms, *Medicago sativa*; Nb, *Nicotiana benthamiana*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Ps, *Pisum sativum*; Pt, *Populus termula x Populus tremuloides*; Sb, *Scutellaria baicalensis*; Ta, *Triticum aestivum*; Zm, *Zea mays*



14. ábra. A növényi RBR fehérje alcсалádokat jellemző szekvenciák összehasonlító analízise, az A pocket doméntól a C terminális régióig. Az azonos aminosav oldalláncokat fekete háttér emeli ki. A RBR jellemző pocket doméneket vonallal jelöltük. A csillagok konszenzus aminosavakat, míg a pontok a hasonló oldalláncokat jelöli. Piros kerettel emeltük ki a jellegzetes foszforilációs helyeket.

V.3.2. A növényi RBR gének exon-intron felépítése

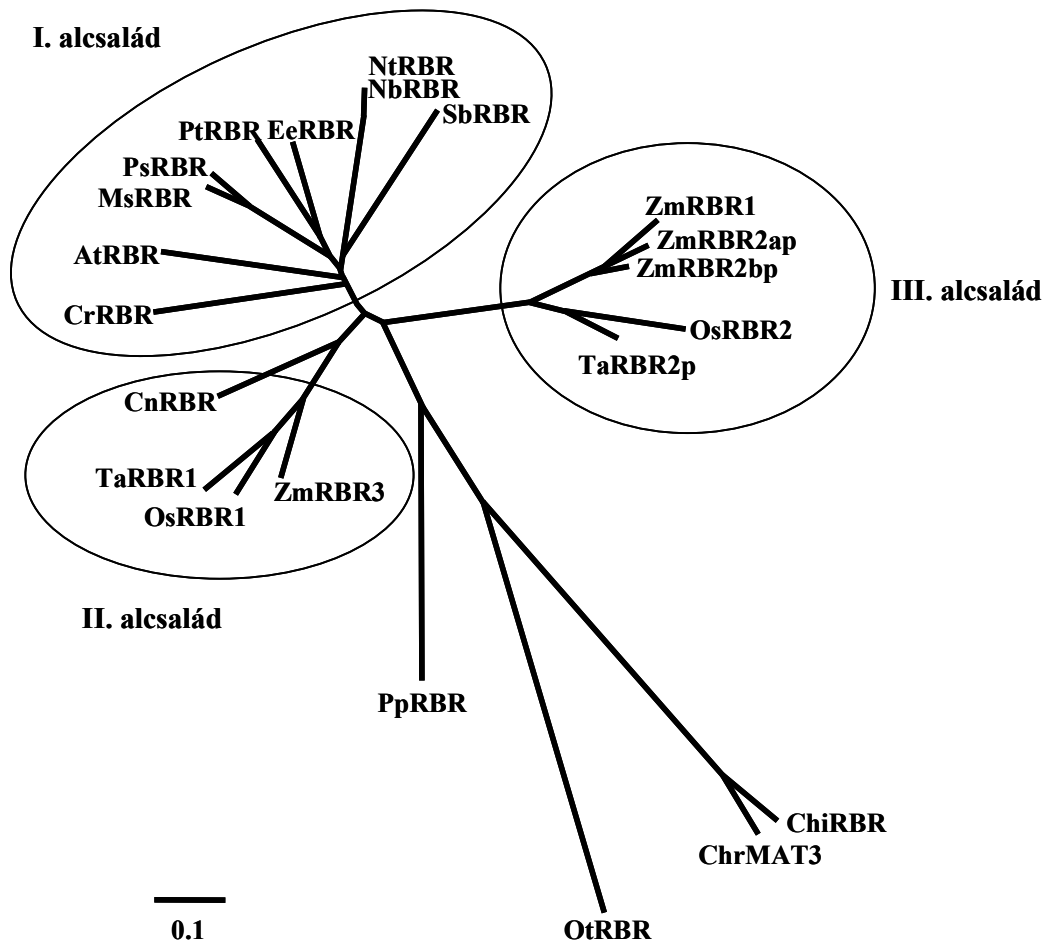
Az *Arabidopsis thaliana* és rizs rendelkezésre álló teljes genomszekvenciája lehetővé tette, hogy összehasonlítsuk a kiválasztott kétszikű és egyszikű gének felépítését. Az *Arabidopsis* retinoblasztóma-szerű gén szekvenciáját a TAIR adatbázisból azonosítottuk (Kong és mts., 2000). Az egyes retinoblasztóma szerű gének kromoszómális elhelyezkedését különböző módszerekkel vizsgáltuk a rizs fizikai térképén (Chen és mts., 2002), az *Arabidopsis* genom szekvencián (<http://www.arabidopsis.org>), és a rendelkezésre álló *Medicago* BAC szekvenciákon (<http://www.genome.ou.edu/MtBACs.html>). Meghatároztuk, hogy az *OsRBR1* a rizs nyolcadik kromoszómáján helyezkedik el (BAC klón: Osch8 P0666G10), míg az *OsRBR2* a tizenegyedik kromoszómán található meg (BAC klón: Osch11 OsJNBa0080108). A 15. ábrán látható az exon-intron határok és az A és B „pocket” domének elhelyezkedésének sematikus rajza az *Arabidopsis* (*AtRBR*), a *Medicago* (*MsRBR1*) és a rizs *OsRBR1* és *OsRBR2* gének esetén. Három RBR gén 18 exon-t tartalmaz a körülbelül 8kb-nyi DNS fragmenteken. Az *MsRBR* esetén egy intron hiányzik, ezért a 14-dik exon olyan hosszú, mint a 14. és 15. exon együttesen a többi vizsgált gén esetén. A konzervált RB domének jelenléte közös minden növényi *RBR* génben. A szekvencia domének elhelyezkedésének vizsgálata azt mutatja, hogy a konzervált A pocket domén a 10. exonon helyezkedik el minden növényi RB-szerű gén esetén és az azt követő exon kódolja a „spacer” régiót. A B domén a következő négy exonon kódolt minden vizsgált növényi *RBR* gén esetén. A rizs *RBR* gének esetén az *OsRBR2* 10. és 11. exonja között azonosítható intron nagyobb, mint a többi növényi szekvencia esetén tapasztaltuk. Az *OsRBR1* gén exon-intron struktúrája nagyfokú hasonlóságot mutat az *AtRBR* génhez és az intronok azonos pozícióban találhatóak a kódoló régióhoz képest (15. ábra).



15. ábra. A növényi RBR gének exon-intron elrendeződése. Az *AtRBR* gén az *Arabidopsis* 3. kromoszómáján helyezkedik el (At3g12880). A *MsRBR* gén megtalálható a mtgsp_001a.6.fasta.screen.Contig4.comp kontig szekvenciában. Az *OsRBR1* gén a rizs 8. kromoszómáján (Os8P0666G10), míg az *OsRBR2* gén a 11. kromoszómáján (Os11 OsJNBa0080108) azonosítható. A négyszögletek az exonok, míg a vonalak az intronok elhelyezkedését mutatják. A nyilakkal az A és B pocket doméneket kódoló régiót jeleztük. A skála a bázispárok számát jelöli.

V.3.3. Növényi retinoblasztóma-rokon fehérjék összehasonlító filogenetikai vizsgálata

Filogenetikai vizsgálatot végeztünk el a feltételezett fehérje szekvenciákon, hogy az RBR fehérje család ismert tagjai közötti kapcsolatot megvizsgáljuk. Az 1. Táblázatban összefoglaltuk a korábban azonosított növényi retinoblasztóma-szerű fehérjéket és azok tulajdonságait kiemelve az eredeti nevüket, az alkotó aminosav oldalláncok számát, molekulatömegüket és izoelektromos pontjukat. A kukorica leközölt részleges RBR fehérjék szekvenciái (ZmRBR2a és ZmRBR2b) a ZmRBR2 fehérje alternatív splice variánsának tekinthető (Grafí és mts., 1996). Továbbá, a ZmRBR1 és ZmRBR2 különbözően érett mRNS variánsok terméke, mivel a homológia ezen két ZmRBR fehérje között magasabb mint 90 %.



16. ábra Növényi RBR fehérjék filogenetikai fája. A “bootstrapped neighbor-joining” módszerrel kapcsolt ClustalW-vel készített “multiple alignment” alapján Phylodendron programmal készítettük el a filogenetikus törzsfát (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>). Az analizált 16 fajból származó 24 szekvencia három RBR alcsaládba rendeződik. Az I. alcsalád tartalmazza a kétszikű RBR homológokat. A II. és III. alcsaládok az ismert egyszikű RBR fehérjéket foglalják össze. A fa alatt levő skála az evolúciós távolságot jelöli. At, *Arabidopsis thaliana*; Chi, *Chlamydomonas incerta*; Chr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Cr, *Chenopodium rubrum*; Cn, *Cocos nucifera*; Ee, *Euphorbia esula*; Ms, *Medicago sativa*; Nb, *Nicotiana benthamiana*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Ot, *Ostreococcus tauri*; Pp, *Physcomitrella patens*; Ps, *Pisum sativum*; Pt, *Populus tremula* x *Populus tremuloides*; Sb, *Scutellaria baicalensis*; Ta, *Triticum aestivum*; Zm, *Zea mays*.

ClustalW programot használtunk a fehérjék összehasonlító vizsgálatára, hogy csoportosítani tudjuk a sokféle növényi fajból ismert különböző RBR fehérjéket. A PHYLIP módszerrel elkészített törzsfá azt mutatja, hogy a növényi RBR fehérjék három csoportba különíthetők el (16. ábra). A I. alcsalád magába foglalja az összes kétszikű RBR fehérjét, mint az AtRBR, EeRBR CrRBR, MsRBR, NtRBR, PtRBR, illetve a PsRBR, míg a II. és III. alcsalád magába foglalja az összes egyszikű RBR fehérjét. A filogenetikai fa határozottan elkülöníti az OsRBR1/ TaRBR1/ ZmRBR3p/ CnRBR fehérjéket az OsRBR2/ TaRBR2/ ZmRBR1/ ZmRBR2 alcsaládtól. A II. alcsaládba tartozó egyszikű RBR2-szerű variánsok egy külön csoportot alkotnak, amelynek nincs homológ megfelelője a kétszikűek között. A nem fűfélékhez tartozó egyszikű *Cocos nucifera* RBR fehérjéje, a CnRBR (Acc.: AAM77469) az egyszikű RBR1 csoportba (II. alcsalád) tartozik és az egyszikű és kétszikűek közötti elágazásban helyezkedik el (16. ábra). A különböző fajok ortológ fehérjéi általában nagyobb hasonlóságot mutatnak egymással az alcsaládon belül, mint az azonos fajon belül a másik RBR fehérjéhez. A 16. ábrán látható adatok alapján, azt feltételezzük, hogy a kétszikűek RBR fehérjéi (I. alcsalád) és az egyszikűek II. alcsaládjá között közelebbi a rokonsági kapcsolat, mint a III. alcsalád és a kétszikű képviselői között. Ezen filogram alapján feltételezzük, hogy az egyszikű gabonanövények egy sokkal összetettebb RB (pathway-vel) rendelkeznek, amely a két különböző RBR fehérjén alapul.

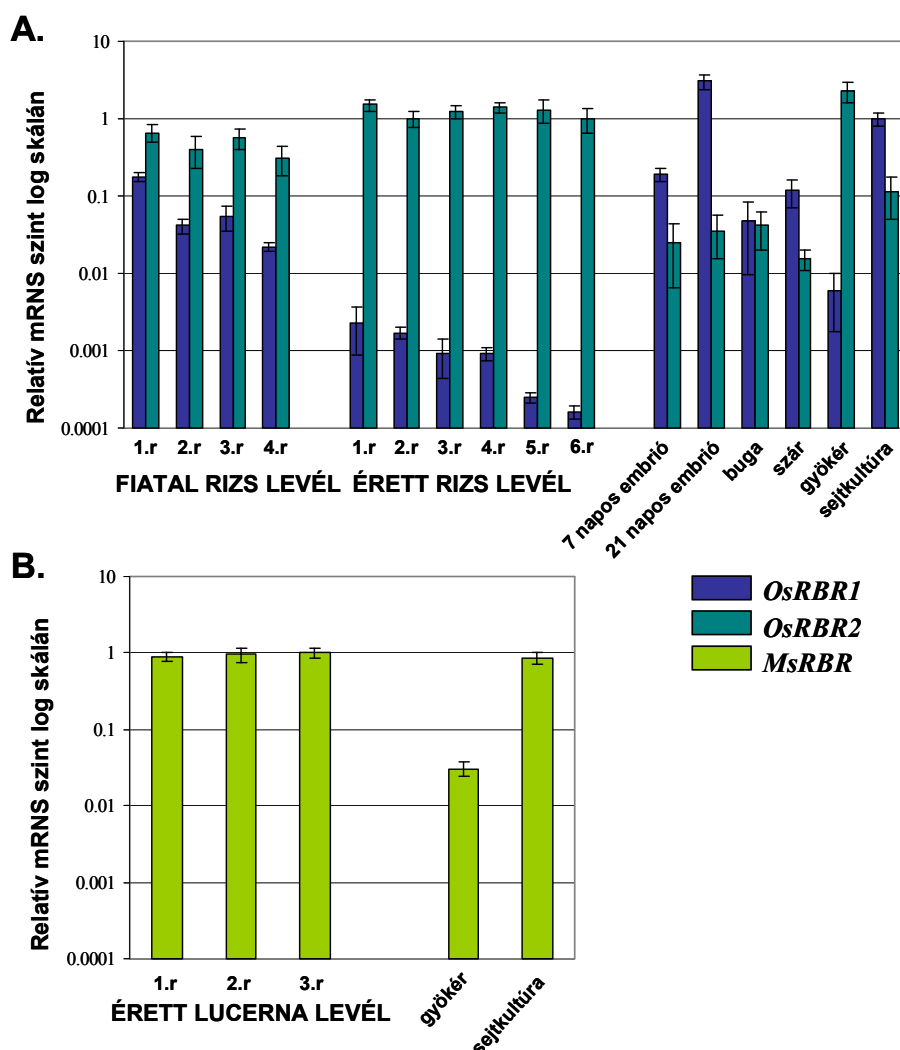
Mivel az RBR fehérjék A/B doménjei nagyon magas szekvencia azonosságot mutatnak, így evolúciósan feltételezhető egy közös ősi gén megléte, amit az alacsonyabbrendű növények vizsgálatával bizonyíthatunk. Így analízisünket kiterjesztettük nem-edényes növényekre is. Az adatbázisokban már megtalálható a *Chlamydomonas reinhardtii*-ből izolált RB-szerű, ún. *Mat3* gén (AF375824), valamint a *Chlamydomonas incerta*-ből azonosított homológ nukleinsav sorrendje (AJ428952), és még ismert az RB-szerű fehérjét kódoló gén mohában is. Az egysejtű növényi szervezetek közül az elmúlt évben tették közzé az *Osterococcus tauri*-ből izolált RBR gén nukleinsav sorrendjét (Robbens és mts., 2005). Ezen megközelítés a filogenetikus fa szélesebb evolúciós elrendezését eredményezte.

Jelen tanulmány adatai alapján feltételezzük, hogy a fajok közötti különbségek genom-gének-fehérjék változásával, evolúciós fejlődésével jellemezhető, esetünkben az RBR gének és általunk kódolt fehérjék által megkülönböztethetjük a kétszikű és egyszikű növényeket.

V.3.4. A növényi RBR gének kifejeződésének jellegzetességei

A különböző rizs és alfalfa RBR gének kifejeződésének mintázatát kvantitatív RT-PCR analízisben vizsgáltuk meg különböző szövetekből származó mintákon. Figyelembe véve a homológ rizs szekvenciák közötti nagymértékű hasonlóságot, az oligonukleotidokat a kevésbé hasonló 5' régióra terveztük, hogy specifikusan tudjuk a célgéneket felamplifikálni. Minden oligonukleotid specifikusan hibridizált a cDNS-hez és a megfelelő méretű PCR terméket eredményezte a reakció. Belső kontrollként minden vizsgált fajban az aktin cDNS-re specifikus primereket használtunk.

Az egyszikű levelek fejlődésére jellemző, hogy egyre emelkedik a differenciálódott sejtek száma a merisztémikus régiótól, a levél alapi részétől fokozatosan nő az érett zónáig, a levélcsúcsig, amelyet már majdnem teljesen differenciált sejtek alkotnak (Grainer és mts., 2000). Erre a megállapításra alapozva felosztottuk a 10 ± 1 cm hosszú fiatal rizs leveleket 4 részre, illetve 6 régióra daraboltuk fel a 30 ± 3 cm hosszú teljesen kifejlődött rizs leveleket. Az alfalfa esetén 3 régióra vágtuk fel az érett leveleket. A 17. ábrán láthatóak a relatív mRNS mennyiségek az actin RNS szintjéhez normálva. A két rizs *RBR* gén kifejeződését a 17. ábra A/ része mutatja, amelyek lényegesen különböznek a növekvő vagy érett levelekben. Az *OsRBR2* transzkript mennyisége jelentősebb volt mind a fiatal, mind a teljesen kifejlett levelek esetén. Az *OsRBR1* és *OsRBR2* gének transzkripciójának hányadosa a levél életkorával összefüggésben van. A fiatal levelekben az *OsRBR2* gén 5-10-szer nagyobb mennyiségben transzkriptálódott, mint az *OsRBR1* gén, míg a teljesen érett levelekben az *OsRBR2* transcript mennyisége több százszor nagyobb volt, mint az *OsRBR1* mRNS szintje. Az *OsRBR2* génnel szemben, az *OsRBR1* gén transzkriptumának felhalmozódása csökkent az alapi régiótól a csúcs felé az analizált levelekben. Ez a mintázat azt sejteti, hogy az *OsRBR1* gén kifejeződése a levél osztódó régiójával van összefüggésben. Ezt a megfigyelést szintén alátámasztja, hogy a génre specifikusan nagyobb transzkript szintet mutattunk ki a fejlődő embriókban és aktívan osztódó sejtenyészetekben.



17. ábra. A vizsgálatainkat képező növényi *RBR* gének relatív génexpressziója. A vizsgált gének relatív transzkript szintjét kvantitatív RT-PCR segítségével határoztuk meg és a konstitutív aktin gén kifejeződéséhez viszonyítottuk. Az összRNS-ben található specifikus transzkript mennyiséget vizsgáltuk fiatal, illetve érett levelekben, 7 napos embriókban, 21 napos embriókban, bugában, szárban, gyökérben és sejtkultúrában. **A,** Az *OsRBR1* és *OsRBR2* gének relatív mRNS szintje a rizs szövetekben. **B,** Az *MsRBR* gén relatív transzkriptum szintje *Medicago* szövetekben. A levél különböző részeit (r) az alaptól a csúcsi régióig növekvő számokkal jelöltünk.

Megvizsgáltuk a rizs *RBR* gének kifejeződését sejtkultúrákban ABA és szalicilsav kezelés hatására. Azt figyeltük meg, hogy egyik rizs *RBR* gén sem válaszolt a hormonkezelésre és állandóan, konstitutíven expresszáltak a sejtszuspenzióban. Az előzőekkel szemben, a I. típusú családba tartozó *MsRBR* génnel rendelkező alfalfa különböző szöveteiben az expresszió vizsgálata azonos transzkript szintet mutatott az érett levél minden egyes régiójában, a gyökér sejtekben és a sejtkultúrában is (17. B/ ábra). Az előbbieken említett eredmények egy lényeges

különbséget mutatnak a két rizs *RBR* génvariánsok között, mivel a kifejeződésük különböző az osztódó és a differenciált sejteket tartalmazó szöveteket tekintve.

Munkánk során megvizsgáltuk a különböző növényi *RBR*-ek transzkripció szintjét, és ezen eredményeink szerint a legjellemzőbb különbség a két rizs gén között a levél különböző részein, valamint a levél fejlődésének különböző állapotaiban van. Az *OsRBR2* gén transzkriptuma azonosítható volt minden vizsgált levélmintában, főleg az idősebb levél metszetekben. Az *OsRBR2* mRNS szintje lényegesen magasabb mint az *OsRBR1* géné mind a fiatal mind az érett levelekben, amiből feltételezhetjük, hogy ennek a génnek nagyobb szerepe lehet a sejtek végleges differenciálódásában és ezen állapot fenntartásában. Annak ellenére, hogy a levélszövetek különböző sejtípusokból épülnek fel, habár nagyrészüket ezeknek a sejteknek már differenciálódott, mint a gyökérben is, ahol a sejtek legtöbbje már kilépett a sejtosztódási ciklusból. Az *OsRBR1* mRNS-e detektálható a levél alapi részében, majd a levélsúcs irányába a transzkript drasztikus csökkenését figyeltük meg, különösen az idősebb levelekben.

Megvizsgáltuk a rizs *RBR* gének kifejeződését fejlődő embriókban és sejt kultúrákban, és azt tapasztaltuk, hogy az *OsRBR1* gén sokkal jobban kifejeződik az osztódó sejtekben gazdag szövetekben, mint az *OsRBR2*. Mivel mind az embriók mind a sejt kultúra gazdag osztódó sejtekben eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az *OsRBR1* gén funkciója sokkal inkább a sejtosztódásban vagy a sejt ciklus folyamatában lehet, mint az *OsRBR2*-nek, aminek inkább a differenciálódásban és a differenciálódott állapot fenntartásában van.

Ezen gén kifejeződési mintázat és az akítvan osztódó sejt szuszpenzióban detektált mRNS szint alapján feltételezzük, hogy az *OsRBR1* gén a sejtek sejtosztódásában fontosabb szerepet játszik. Mindezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a különböző rizs *RBR* gének kifejeződési mintázata funkcionális különbségekre is utal, mint már azt az állati és emberi szervezeteknél is megfigyelték.

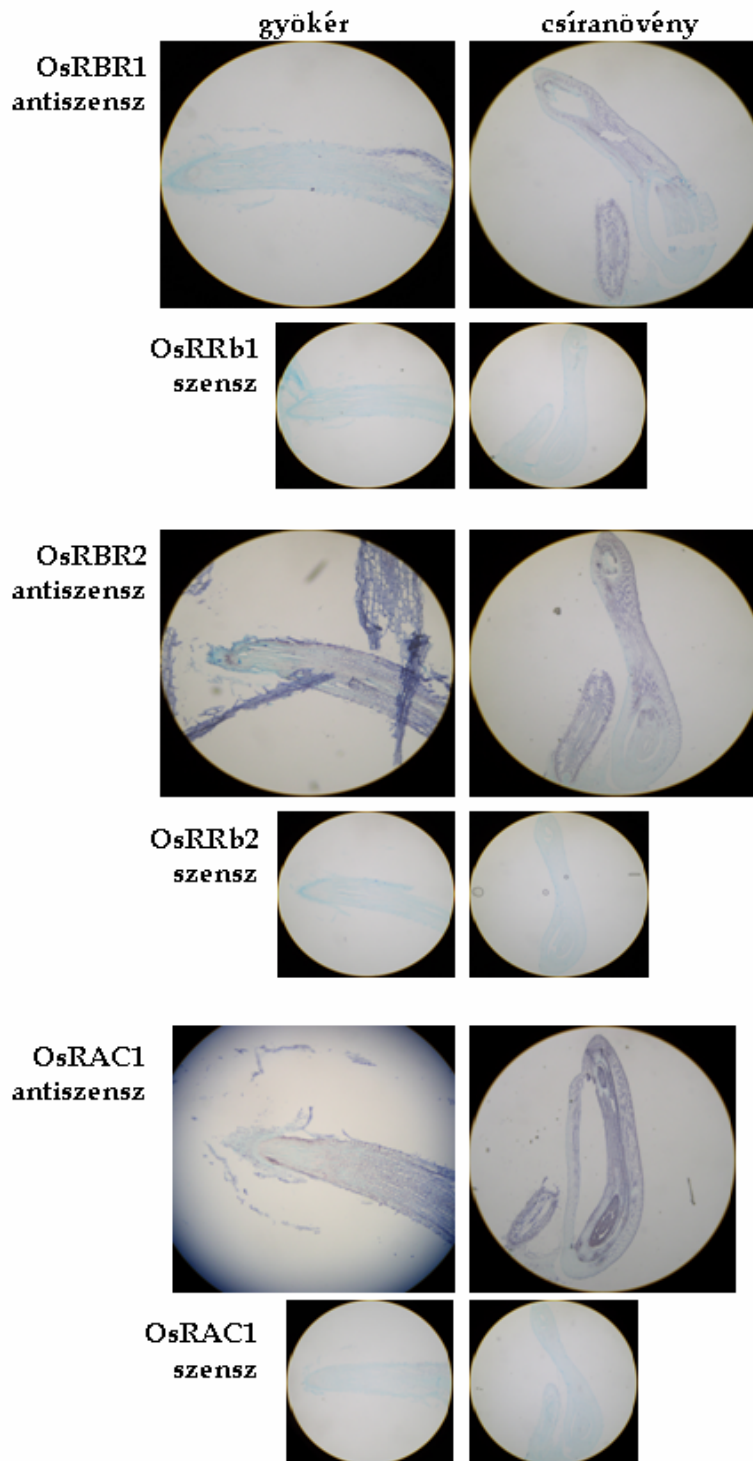
A vizsgált kétszikű, *Medicago* esetében az egyetlen *RBR* gén fejeződik ki. Az *MsRBR* gén mRNS szintje állandó, konstitutív volt a különböző levél szegmensekben. Hasonló transzkript szintet detektáltunk gyorsan osztódó sejt kultúrában is, ami azt engedi feltételezni, hogy a kétszikű *RBR* gén kifejeződése független a jelenlegi osztódási állapottól a vizsgált szövetekben. Az elektronikus adatbázisban közzé tett *Arabidopsis* transzkripció adatok is ezt a feltételezést erősítik meg. Ez nem meglepő,

mivel ez arra utal, hogy a kétszikűekben egy gén végzi el ugyanazt a feladatot, amit az egyszikűeknél két gén.

V.3.5. RBR gének expressziós analízise mRNS *in situ* hibridizációval

Munkánk során megvizsgáltuk a rizs *RBR* gének mRNS-ét *in situ*, az az sejten belüli térbeli elhelyezkedését, hogy meghatározzuk térbeli és időbeni kifejeződésük mintázatát rizs növényekben. *In situ* hibridizációs kísérleteket végeztünk gyökér és hajtás metszeteken. A rizs *OsRBR1* gén transzkriptuma a gyökér egészét tekintve megfigyelhető, habár a transzkript szint alacsonyabb, nem olyan magas, mint az *OsRBR2* gén kifejeződése esetén. Az *OsRBR2* gén mRNS felhalmozódása kimagasló a gyökér differenciálódott sejtjeiben. Hasonló figyelhető a hajtáscsúcs metszeteken végzett vizsgálatokon. Az *OsRBR2* gén transzkriptuma nagyon magas szintű a hajtáscsúcs differenciálódott részein, mint azt a 18. számú ábra is mutatja. Ezen eredmények is megerősítik az előzőekben is tárgyalt kvantitatív gén kifejeződési szintekből levont következtetéseinket.

A kísérleteinkben kontrollként az aktin gén mRNS szintjét vizsgáltuk, mint állandóan kifejeződő gént, összhangban a kvantitatív RT-PCR eredményekkel. Korábbiakban bemutattuk Real-Time RT-PCR kísérletekben, hogy az aktin gén állandó kifejeződést mutat mind hajtás, mind gyökérben is, valamint osztódó és differenciálódott sejtekben is, amit ezen vizsgálataink során is bizonyítottunk. *In situ* hibridizációs vizsgálataink eredményeiről megállapíthatjuk, hogy összhangban vannak kvantitatív RT-PCR eredményeinkkel, amely megerősíti azon feltételezésünket, hogy az *OsRBR2* génnek a differenciálódásban, illetve a differenciálódott állapot fenntartásában kiemelkedő szerepe van.












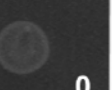
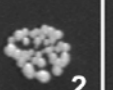




18. ábra. A rizs RBR génjeinek *in situ* hibridizációs kimutatása gyökérben és csíranövényben. A szövegben leírt *OsRBR1*, illetve *OsRBR2* géneknek, megfelelő jelölt anti-szensz RNS-sel vizsgáltuk a metszeteket. Konstitutív génként a *OsRAC1* gént használtuk, míg az adott gének szensz próbái szolgáltak a kísérlet negatív kontrolljaként.

V.3.6. Az RB-szerű fehérjék szelektivitása fehérje kölcsönhatásokban

A teljes *MsRBR* (pGBT9/*MsRBR*), *OsRBR1* (pBD-GAL4 2.1/*OsRBR1*) és *OsRBR2* (pBD-GAL4 2.1/*OsRBR2*) géneket tartalmazó plazmidokat használtuk mint “bait”-et (csalit) az élesztő két hibrid kísérletekben az élesztő PJ69-4A törzsben (James és mts. 1996), amelyet együtt transzformáltuk olyan “prey” vektorokkal, amelyek a rizs RBR Interactor partnereit (*OsRBR12* and *OsRBR15*), a *Medicago* cyclin D5 (*Medtr*;CycD5), a *Medicago* PP2A foszfatáz B” szabályozó alegységét, illetve a Kukorica Csíkoltsági Vírus RepA (*MSV RepA*) tartalmazta (Horváth és mts., 1998). Mint a 19. ábrán látható, mind a három növényi RBR fehérje kölcsönhatott a virális replikációs fehérjével, amely tartalmazza az ismert LxCxE RB-kötő domént. Egyik sem volt képes kötődni a *Medicago* D-típusú ciklinhez (*Medtr*;CycD5), amelyben nem található meg ez a motívum. Munkánk során elvégeztünk egy nagyon alapos élesztő két-hibrid analízist, amelyben a teljes *MsRBR* fehérjét használtuk, mint “bait”, így sikerült azonosítani egy *Medicago truncatula*-ból izolált kölcsönható partnert (TC109726, BI270584 és AW692851 által kódolt szekvencia). Ez a fehérje a Voorkoeve és mts. által leírt PP2A fehérje B” szabályozó alegységével mutat homológiát (39 % azonosság és 57 % hasonlóság az egér PR59 PP2A szabályozó alegységével). A további analízisek azt mutatták, hogy ez a fehérje különbséget tud tenni a két rizs RBR fehérje között a kapcsolat erősségét figyelembe véve. Az alfalfa *MsRBR1* és a *OsRBR1* fehérjék erős kölcsönhatást mutattak a PP2A B” szabályozó alegységgel, míg az *OsRBR2* nem hatott kölcsön ezzel a “prey” fehérjével (19. ábra). Továbbá az *OsRBR1* fehérjét, mint “bait”-et használtuk élesztő két-hibrid analízisekben, így azonosítottunk egy új kölcsönható fehérjét, az *OsRBR12*-t, amely szintén eltérést mutatott az analizált kétszikű és egyszikű RBR fehérjékkel való kölcsönhatás erősségében. Adatbázis keresések alapján az *OsRBR12* egy AK101154-hez (cDNS_klón_J033027D16) hasonló expresszáladó fehérje, amelynek funkciója még nem ismert ezidáig. Egy másik kölcsönható fehérje, az *OsRBR15* a NAC fehérjékhez mutatott hasonlóságot (LOC_Os02g38130, a TIGR Rizs Genom Adatbázis alapján). Ez a kölcsönható is tartalmazza az RB-kötő motívumot (LxCxE), tehát kapcsolatot tud létesíteni az analizált RBR fehérjékkel, de különbséget figyeltünk meg a kölcsönhatás erősségében. A szerkezet alapján eddig megállapított nagyobb hasonlóság az alfalfa *MsRBR* és a rizs *OsRBR1* között fennáll a kölcsönható

partnerek esetén is, amely a I. és II. alcsalád között meglevő közelebbi funkcionális rokonsággal magyarázható. A bemutatott fehérje-fehérje kölcsönhatás tovább erősíti feltételezésünket a rizs RBR fehérjék funkcinális különbözőségéről.

	MsPP2A regB"	OsRBR12	OsRBR15	MSVRepA	Self activation
MsRBR	 112*	 55	 45	 140	 0
OsRBR1	 12	 42	 22	 21	 0
OsRBR2	 0	 0	 2	 67	 0

19. ábra. Növényi RBR homológ kölcsönhatások élesztő két-hibrid rendszerben.

A RBR fehérjék kölcsönhatásainak meghatározására a szövegben leírt “bait” és “prey” konstrukciókat együttesen PJ69-4A élesztő vonalakba jutattuk és SD-Trp-Leu-Ade-His szelektív médiumot tartalmazó lemezekre szélesztettük. A relatív β -galaktozidáz aktivitásokat Horváth és mts. (1998) által leírt módszerrel határoztuk meg. A szórást minden esetben kevesebb volt, mint 10%. Az *OsRBR12* egy ismeretlen fehérjét jelöl, míg az *OsRBR15* a NAC családkhoz tartozó transzkripciósfaktor.

* Relatív β -galaktozidáz aktivitás értékek.

Az élesztő két-hibrid vizsgálatainkat összegezve arra következtethetünk, hogy az RBR fehérjék funkciója megosztott az egyszíkiek két RBR fehérje között. Mind szerkezeti mind funkcionális hasonlóságok és különbözőségek is megfigyelhetők az egyes RBR alcsaládok között. Ezen jellegzetes RBR tulajdonságok kötik össze az egyes alcsaládokat és egy közös őst gén meglétére utalnak.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

VI.1. Szinkronizációs kísérletek

Az elérhető rizs sejtvonalak száma elég kevés, ezenfelül ezen kultúrák szinkronizációját még nehezebb megvalósítani. Napjainkig nincs olyan leírt módszer, mellyel kellőképpen eredményes szinkronizációt lehet elvégezni, hogy az egyszíkűek sejtciklusa részletesebben tanulmányozhatóvá váljon. Munkánkkal bemutattuk, hogy a Taipei-309 és Unggi9 rizs fajtákból létrehozott sejtenyészetek kellő gyorsasággal osztódtak, amivel megfelelő szinkronizációs hatékonyságot értünk el, melyet a sejtciklus fázisok jó elkülöníthetősége mutat. Így ezen sejt kultúrák alkalmasakká váltak-válhatnak a sejtosztódást szabályozó gének kifejeződésének vizsgálatára.

A relatív magasfokú S-G2-M fázisos szinkronizációt a sejtek hidroxipiureával való blokkolásával valósítottuk meg. A hidroxipiureával kezelt növényi sejtek a G1-S fázisok közötti átmenetben ragadtak meg, mivel a hidroxipiurea ribonukleotid redukáló gátló vegyület, így blokkolja a DNS szintézist és a sejt osztódást. Ugyanakkor a hidroxipiurea reverzibilisen gátolja a sejt ciklus folyamatát a növényekben. A gátlószert mosással távolítottuk el a rendszerből, így a sejtek 25 %-a S fázisban volt a mosást követő 15.-18. órában, majd a sejtek 59 % G2 fázisba kerültek a 21. órában, az Unggi9 sejtek első mitotikus osztódásuk bekövetkezte előtt. Megfigyeltük, hogy a sejtek újra G1 fázisba és második S fázisba léptek.

Ezen sejt ciklus fázis mutatók a Taipei-309 fajta esetén sokkal korábbi időpontban bekövetkeztek, azaz az S fázisos csúcs a blokkoló anyag eltávolítását követő 6 óra körül, és a mitotikus csúcs a mosást követő 15. órában volt. A Taipei-309 sejt vonal esetében is megfigyeltük, hogy a sejtek a második sejtosztódási folyamatukba lépnek. Ez azt mutatja, hogy minden egyes fajta különbözőképpen viselkedik mint sejt kultúra, és teret biztosít szélesebbkörű vizsgálatokra. Ugyanakkor feltételezhető, hogy a blokkoló anyag toxikusságát a különböző sejt vonalak különbözőképpen tolerálják, amely ismerete nagyon fontos a további kísérletekhez.

A növényi sejt ciklus is két kulcs ellenőrzőpont által szabályozott, amelyek a G1 és a G2 fázisok végén vannak. (Huntley és Murray, 1999; Mironov, 1999) Ezen sejt ciklus határokon való áthaladás specifikus fehérje kináz komplexektől függ,

melyek a katalikus alegységet alkotó CDK-kból és a szabályozó alegységet képező ciklinekből épülnek fel. Tipikus sejtciklus gének kifejeződését figyelhettük meg a szinkronizáció sikerességének ellenőrzésére alkalmazott kvantitatív RT-PCR kísérletek során. A sejtciklus fázisaiban specifikusan kifejeződő gének mRNS szintjének követésével bizonyítottuk a szinkronizációs rendszerünk használhatóságát további vizsgálatokhoz.

Eredményeink, azaz felhasznált rizs sejttenyészetek és az alkalmazott szinkronizációs technika a gének kifejeződésének időbeli változásának tanulmányozását, ugyanakkor a lehetséges sejtciklussal kapcsolatos feltételezett gének aktivitásának vizsgálatát, és ezáltal sejtciklusban betöltött szerepük feltárását segíti elő.

A magasabbrendű eukarióták közül a legmagasabb szinkronizációs szintet a BY-2 dohány sejteken érték el, ahol aphidicolinnal végzett szinkronizációs kísérletben 90 % a sejteknek S fázisban volt, és 45-50 %-os mitotikus értéket figyeltek meg. Ez természetesen arra ösztönöz, hogy a jövőben a rizs sejt kultúrák aphidicolinos kezelését tovább optimalizáljuk a módszer hatékonyságának növeléséért.

VI.2. Lucerna Ciklin függő kinázok túltermeltetésének hatásai rizs növényekben

A sejtosztódás meghatározó mechanizmus a növény fejlődésében, habár a pontos szabályozási folyamat még nem ismert. A sejtciklust szabályozó fehérjék szerepét a növényi fejlődésben a napjaikban ismeretes transzgenikus vonalakon végzett túltermeltetés vagy expressziós szintben való csökkenés által bekövetkező hatások alapján értékelhetjük. A mutációs megközelítést nehéz felhasználni sejtciklus kutatásban, mivel a sejtciklusban esszenciális gének mutációja gyakran bizonytalan (Thomas, 1993) vagy a fenotípus túl erős és embrionális halálhoz vezet. Növekedésben bekövetkezett változás eredhet metabolikus útban történt mutációból is, amit nehéz megkülönböztetni, elkülöníteni a sejtosztódásban történt változásoktól (Traas és Laufs, 1998). A CDK kináz aktivitása a ciklin szabályozó egységekkel meghatározott. A ciklin/CDK komplexek aktivitása pedig a szabályozó mechanizmusok, azaz transzkripció, proteolízis, foszforiláció/defoszforiláció, kölcsönhatások más szabályozó fehérjékkel és a sejten belüli kommunikáció által

befolyásolt. A ciklik függő kinázok tanulmányozásához ezen fehérjéket túltermelő transzgénikus növényeket hoztunk létre és vizsgáltunk.

Tanulmányunk során a *CDKA1;1* gént konstitutívan kifejező transzgénikus növényeknél a szemtermés kialakulásában megfigyelt fenotípust alapján arra következtethetünk, hogy ezen kináznak nem csak a sejtciklusban, hanem a gametogenezisben, termés kialakulásában van nagyon fontos szerepe a növény fejlődése során.

Kísérleteinket követően nemrégiben Iwakawa és mts. (2006) létrehoztak a *CDKA1;1* génben mutáns *Arabidopsis thaliana* növényi vonalakat. Ezen mutánsok vizsgálata során megállapították, hogy a homozigóta mutánsok embriói elhaltak. Ezen funkcióvesztéses mutáns növények generatív sejtjeinek proliferációja gátolt a hímivari gametogenezis során. Kísérleteik során haploid *cdka-1* mutánsok mikrospórái normálisan, asszimmetrikusan osztódtak és az első mitotikus osztódás (PMI) folyamatával bicelluláris pollenszemek képződtek. A nagyobb vegetatív sejtek nem osztódtak, ugyanakkor a kisebb generatív sejtek tovább haladtak a második osztódásban (PMII), így létrejöttek a tricelluláris pollen szemek. Ezen *CDKA1;1* génben mutáns növények, habár képeztek érett bicelluláris pollen szemeket, tartalmaztak egyedi pollenszerű sejtet és vegetatív sejtet, de nem voltak képesek átlépni a második osztódáson (PMII). Ezen tanulmány megerősíti azt a következtetésünket, hogy a CDKA1 kinázoknak a generatív képletek sejtosztódásának szabályozásában és fejlődésében van fontos szerepe.

A B-típusú ciklin függő kinázok mind a G2 fázis, mind a mitózis legfontosabb szabályozói. Munkánk során tanulmányozott CDKB1;1 kináz túltermelésének eredményeként a növények növekedésében bekövetkezett változások mutatják, hogy a *CDKB1;1* gén sejtcikluson keresztüli szabályozása meghatározó a növény fejlődésében.

A PROPORZ1 (PRZ1) gén mutációjának vizsgálatánál a CDKB1;1 és a E2Fc gének kifejeződésének növekedését tapasztalták, amely a nem-differenciálódott kallusz szerű sejtstruktúrák kialakulásához vezetett (Harray és mts., 2003). További CDKB1;1 kinázzal kölcsönható fehérjék azonosításával pontosan megismerhetjük, hogy milyen szabályozási utakon keresztül fejti ki hatását ez a növény specifikus kináz.

Boudolf és mts. (2004) létrehozta egy CDKB1;1 domináns negatív allélt túltermelő (CDKB1;1N161) transzgénikus vonalat, amelynél a gázcsereváltások száma csökkent, összhangban ezzel a megfigyeléssel a hajtás és az első levelek méretében is csökkenést figyeltek meg. Ugyanakkor megállapították, hogy a CDKB1;1 kináz aktivitása G2 fázisban magas (Magyar és mts., 1997), így stimulálva a G2 fázis és mitózis közötti átmenetet, meghatározva az osztódó és endoreduplikálódó sejtek közötti egyensúlyt. A sejtek ezen választási lehetőségét a CDKB1;1 kináz az E2F/DP transzkripciós faktorokkal (Boudolf és mts., 2004) és a különböző CDK inhibitorokkal, CKI/KRP fehérjékkel együtt szabályozza (De Veylder és mts., 2001). Az ismert tanulmányokkal összhangban és saját megfigyeléseink alapján úgy véljük, hogy a CDKB1;1 fehérjék szabályozó szerepe meghatározó a sejtciklus során, ami további befolyással bír a növény fejlődésére, azaz ezen szabályozó egység összekapcsolja a sejtosztódás és a differenciálódás szabályozását a növény növekedése során.

A CDK B2-típusú kinázok szabályozzák a mitotikus folyamatot a növényi sejtekben a CycB2;2 fehérjén keresztül. Munkánk során vizsgált lucerna CDKB2 kináz túltermelése a növények korábbi virágzási idejét eredményezte, melyből arra következtethetünk, hogy ezen fehérje hatására megváltozott a fejlődési folyamat szabályozottsága.

A CycB2;2 fehérjét túltermelő transzgénikus növény felgyorsult gyökérnövekedést mutatott (Lee és mts., 2003). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ezen változás a CDKB2 kinázokra is hatással volt, mivel a CycB2 és a CDKB2 komplexet képez, hogy végbe menjen a citokinezis. További analízisek még szükségesek, hogy pontosan meghatározzák, hogy vajon a sejtciklus maga gyorsult-e vagy a sejtosztódás időtartama változott a CDKB2 aktivitása által.

Baldet és mts. (2006) L1 (azaz 1 gyümölcs kocsányonként) és L5 (azaz 5 termés/kocsány) paradicsom növényeket hasonlítottak össze morfológiai, biokémiai és molekuláris szinten. Megállapították, hogy a L1 paradicsom növényeknek nagyobbak a virágai és a termések mérete is nagyobb volt, ami összefüggésben van azzal, hogy a magházakban levő sejtek száma több volt. Feltételezik, hogy ez a jelenség a virág növekedésének gyorsulása miatt következett be, mivel más egyéb paraméterek esetén nem tapasztaltak változást. Ezen L1-es növényekben a CDKB2;1 gén kifejeződése jelentősen megnövekedett a korai virágfejlődés során.

Ezen eredmények megerősítik azt a hipotézist, hogy a fejlődő termés mitotikus aktivitását szabályozza a CDKB2;1 összehangolva más folyamatokkal együtt, mint például a fotoszintetikus aktivitás. Ezen lehetséges folyamatok vizsgálatával megerősíthetjük eddigi eredményeinket.

A sejtciklus módosítása egy lehetőség a sejtciklus elemeinek vizsgálatára. Munkánk során a sejtciklust szabályozó gének növény növekedésre gyakorolt hatását vizsgáltuk transzgénikus növényekben. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a sejtosztódás regulációja meghatározó a növény növekedésére, és kísérletünk új irányt mutattak a sejtciklus-specifikus fehérjék funkciójának tanulmányozására nemcsak sejtszinten, hanem a teljes növény növekedését figyelembe véve is.

VI.3. Növényi retinoblasztóma-szerű fehérjék

Az elmúlt években megnövekedett a figyelem a retinoblasztóma fehérjecsaldá iránt, hogy meghatározzák azokat a molekuláris markereket, amelyek a sejtosztódásban és növekedésben is fontos szerepet játszanak. Továbbá, a RBR fehérjéről tudott, hogy kiemelkedő szerepük van a növényi növekedés és fejlődés szabályozásában. Ezen tanulmány a növényi RBR gének összehasonlító vizsgálatára összpontosul. Munkánk során öt cDNS-t azonosítottunk, melyek új képviselői a növényi RBR fehérje családnak, nevezetesen az a pillangósok modell növényéből, lucernából izolált *MsRBR*-et, az *OsRBR1*-et és *OsRBR2*-t, mely géneket rizsből izoláltunk, valamint a *TaRBR1*-et és *TaRBR2*-t, amelyeket búzából azonosítottunk. Ezen gének az úgynevezett pocket proteinek kódolják, és minden egyes fehérje, mely az RBR fehérjecsaldához tartozik tartalmazza mind az állatokban és növényekben is nagyon konzervált A/B doméneket.

A géneket összehasonlító analízisek elősegítik a kódoló és nem kódoló régiók konzerváltságának tanulmányozását valamint a genom evolúciójára támaszkodva a molekuláris folyamatok jellemzését. Az emberi RB fehérjecsaldáról tudott, hogy a *HuRB1* transzkriptumot 27 exon kódolja, míg a család másik két tagja esetében, mind a *p107* gén mind a *p130/RB2* gén 22-22 exonba szerveződik. Nem meglepő, hogy a *p107* és *p130/Rb2* gének genomiális szerveződése nagyobb hasonlóságot mutat egymáshoz, mivel feltételezhető, hogy szorosabb evolúciós rokonságban vannak. Az általunk vizsgált növényi *RBR* gének 18 exonból és 17 intronból állnak és a hasonló exonok azonosak méretben és nagyon hasonlóak nukleinsav és aminosav szinten is. A

növényi *RBR* gének fehérjét kódoló régiói 18 exonba szerveződnek, ami körülbelül 7000 bp hosszú genomi DNS-en helyezkedik el. (lásd. 10. ábra). A konzervált A pocket domént kódoló rész a 10. exonon helyezkedik el minden egyes növényi *RB*-szerű génnél. Mindezek ismeretében arra következtethetünk, hogy a konzervált doméneket kódoló exonok mind méretben mind szerveződésben tipikus jellegzetességei a növényi *RBR* géneknek, mint ahogy az a gerincesek *RB* családjának tagjainál is van. Az exon-intron szerveződés alapján arra következtethetünk, hogy az egyszikű II. típusú *RBR* gének közelebbi rokonságban vannak a kétszikű *RBR* génekkel.

A fehérje szintű összehasonlító vizsgálataink által létrehoztuk egy filogenetikus fát (lásd. 11. ábra), amely 18 növényi fajban található *RBR* fehérjék hasonlóságán alapul. Ezen filogenetikus fa alapján az egyes *RBR* fehérjéket különböző alcsaládokba tudjuk csoportosítani az aminosav sorrendben mutatott hasonlóságokra alapozva. Ezen eredmények által az egyszikűek *RBR* fehérjéit két jellemző alcsaládba tudtuk sorolni (alcsalád II. és III.), míg a kétszikűek egyetlen *RBR* fehérjei egy különálló csoportot képeznek, (lásd 11. ábra). Így az általunk izolált *MsRBR* az I. alcsaládba sorolható, amely magában foglalja az adatbázisokban elhelyezett összes ismert kétszikű *RBR*-t. *Arabidopsis thaliana*-ban bizonyították az egyetlen *RBR* gén jelenlétét a teljes genom meghatározásával.

A munkánk során kiterjedt *in silico* analízist végeztünk, hogy ezt a felételezést mi is megerősítsük. Az elmúlt évben, 2006-ban befejezték a lucerna genom szekvenálást is, amelyet szintén alaposan megvizsgáltunk, így ezen ismeretek tudatában arra a következtetésre jutottunk, hogy a kétszikű növényekre jellemző az egyetlen *RBR* gén megléte.

Filogenetikus összehasonlító vizsgálataink során bevontuk már ismert alacsonyabbrendű növények *RB*-szerű génjeik által kódolt feltételezhető fehérjéinek szekvenciáit is. Mindezen tanulmányok és ismeretek megerősítik azt a feltételezésünket, hogy az *RBR* gének egy közös ős génből való evolúciós fejlődésének lehetünk tanúi, ha a növényi *RB*-szerű géncsalád tagjait vizsgáljuk. Ugyanakkor feltételezhetjük, hogy az evolúció során a fajfenntartás érdekében a gén duplikáció által megosztottá vált az ős gén funkciója, de a szerkezeti konzerváltság miatt még képesek maradtak bármilyen más eredeti funkció ellátására, ha bármelyik gén kifejeződése gátoltá válna.

Az evolúció során a fehérjék között specifikus kölcsönhatások alakultak ki, ami alapján feltételezzük, hogy az általunk vizsgált fehérjék funkcionális különbözőségeinek egyik lehetséges oka. A D-típusú ciklinek tartalmazzák azt a specifikus ún. LxCxE motívumot, amely az RB fehérjékhez kapcsolódni képesek. Roudier és mts. bizonyították, hogy lucernából izolált A2-típusú ciklin képes kölcsönhatást létesíteni a kukorica ZmRB1 fehérjével. Szintén bizonyított, hogy a vírus fehérjék a fertőzés során kapcsolódnak az RBR fehérjékhez befolyásolva a sejt sejtciklusát és ezáltal késztetik a gazdasejtet a vírus megsokszorozására. A élesztő két hibrid eredményeink jól mutatják a hasonlóságokat és a különbözőségeket az RBR protein alcsaládok között a fehérje kölcsönhatásokban.

Minden egyes alcsalád tagja képes kötni az LxCxE motívummal rendelkező fehérje partnereket. Az általunk vizsgált egyik ilyen fehérje az eddig még nem azonosított növény specifikus NAC-szerű (NAM-ATAF-CUC) fehérje, vizsgálatainkban OsRBRI5. A NAC családba tartozó génekről tudott, hogy sokféle sejtfolyamatban játszanak szerepet, mint a szervek fejlődésében és morfogenezisben, valamint különböző stressz válaszokban, mint vírusfertőzés, sebzés (Olsen és mts., 2005). Természetesen további kísérletek szükségesek, hogy pontosan meghatározhassuk azokat a szabályozási pontokat, amit a kölcsönhatásukkal befolyásolnak, de feltételezhető, hogy nagyon fontos ezen fehérjék kölcsönhatása, mivel mind az RBR mind a NAC-szerű fehérjék sokféle folyamatokban fejtik ki hatásukat.

A vizsgált gének mRNS mintázatának tudatában, a fehérje szint valamint annak foszforiláltsági állapotának vizsgálatával fény derülhet ezen fehérjék szabályozó szerepére. A növényi RBR fehérjéket CDK komplexek foszforilálják, amint az Nakagami és mts., valamint Boniotti és mts. már igazolták. A fehérje módosulása egyféle szabályozó rendszer, esetünkben az RBR proteinek az E2F/DP transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatáson keresztül irányítják a sejtciklust. (DeWitte és Murray, 2003) A foszforilációs folyamatok vizsgálata is fontos, hogy megértsük e szabályozó rendszereket és a funkcionális különbségeket a növényi RBR fehérjék között.

Az RB fehérjék szabályozó funkciója alapvetően függ a foszforiláltsági állapotuktól, ami a PP1 és PP2A foszfatázok által szabályozott. (Yan és mts., 1999) Élesztő két hibrid vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a lucerna MtPP2A B'' szabályozó alegysége erős kölcsönható partnere a lucerna MsRBR-nek, valamint

képes kölcsönhatást létesíteni a rizs OsRBR1 fehérjével, ellenben a másik rizs OsRBR2-vel egyáltalán nem volt kimutatható a kölcsönhatás. Hasonló helyzet áll fenn az emlős RBR pocket fehérjéi esetében is. Rágcsálók RB fehérjéi közül csak a p107 protein mutatott erős kölcsönhatást az ún. PR59 PP2A B'' szabályozó egységgel, míg a pRB nem. Kísérleteikben vizsgálták a P59-PP2A komplex defoszforilációs aktivitását a megkötött p107 fehérjére nézve, valamint a U2-OS sejtben túltermeltett foszfatáz alegység a sejtciklust gátolta a p107 fehérje szabályozásán keresztül és a sejtek a G1 fázisban halmozódtak fel. (Verhoove és mts., 1999)

Ezen tanulmány során az új növényi *RBR* gének azonosításával és összehasonlító vizsgálatukkal bővítettük az ismereteket, mellyel evolúciós szempontból csoportosíthatjuk az RBR fehérjéket. A egyszíkű fűfélékben meglévő kétféle RBR fehérjék gén szerveződési, gén kifejeződésének, fehérje szerkezetük és kölcsönható partnereik vizsgálatai alátámasztják a különbséget az egyszíkűek és kétszíkűek RB szabályozó mechanizmusa között. A fűfélékben a két különböző RBR fehérjék jelenléte egy sokkal összetettebb szabályozó folyamatra utal, amit a korábbiakban feltételeztünk. Természetesen a pontos mechanizmus megismeréséhez további tanulmányok szükségesek mind nukleinsav mind fehérje szinten.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

(Tézispontok)

VII.1. Rizs sejtek szinkronizációja

I. A növényi sejtciklus tanulmányozásához szinkronizációs kísérleteket végeztem felhasználva az osztódás során bekövetkező sejtmagi DNS tartalom változás mérésének lehetőségét áramlási citometriával. Első lépésként meghatároztam a megfelelő blokkoló anyagot és annak használati körülményeit optimalizáltam. Így kísérleteimben hidroxisureával kezeltem a sejt kultúrákat majd a gátló ágens kimosását követően áramlásos citométerrel detektáltam a két rizs sejtenyészeti sejtmagi DNS tartalmának változását. A szinkronizációs kísérleteimről elmondhatom, hogy a hidroxisurea G1/S fázisban állította meg a sejtek többségét, majd az azt követő mosással a sejtek folytatták a sejtciklust, idővel G2/M fázisba léptek.

II. Az Unggi9 sejt kultúra szinkronizációs vizsgálatáról megállapítottam, hogy valamivel hosszabb a sejtciklus időtartama, mivel a G2 fázis, majd az azt követő mitózis csak 21 óra környékén detektáltam.

III. A Taipei-309 sejt vonalon végzett kísérleteknél megfigyeltem, hogy a blokkolt majd reaktivált sejtenyészeti sejtek már 12-15 óránál G2 fázisba jutottak. A két különböző sejt kultúra vizsgálata során megállapítottam, hogy a fajták között is jelentős különbségeket figyelhetünk meg, ami nagyon fontos az összehasonlító analíziseknél.

IV. Sejtciklus specifikus gének kifejeződésének kvantitatív RT-PCR vizsgálatával igazoltam a Taipei-309 sejt kultúrára végzett szinkronizációs kísérlet sikerességét, mely a továbbiakban a sejtciklus tanulmányozás fontos technikája az azt követő kísérletekben.

VII.2. Lucerna CDK fehérjék túltermeltetésének tanulmányozása rizs növényekben

V. Munkám során lucerna CDK fehérjét túltermelő rizs transzgénikus növényeket hoztam létre, hogy tanulmányozzam ezen sejtciklus specifikus fehérjék növekedésre, fejlődésre gyakorolt hatásait.

VI. A Medsa;CDKA1;1 fehérjét túltermelő transzgénikus növényekben az érett termés/szemek számában detektáltam változást, ami felveti, hogy a CDKA1 kinázok a sejtosztódás szabályozó szerepük mellett a szaporító képletek fejlődését is befolyásolják.

VII. Tanulmányaim során a Medsa;CDKB1;1 kinázt túltermelő növényeknél fenotípusos változást figyeltem meg, azaz ezen transzgénikus növények mérete kisebb volt a kontroll növényekhez képest.

VIII. A mitotikus kinázok közül a Medsa;CDKB2;1 vizsgálatát végeztem ezen kinázt túltermeltető transzgénikus növényeket létrehozva. Megfigyeltem, hogy ezen módosított növények korábban virágoznak, mint a kontroll növények.

VII.3. A növényi RBR gének és kifejeződésük tanulmányozása

IX. Munkám során jellemeztem a rizs *RBR* géneket és a lucerna *RBR* génjét. Ezen növényi gének új képviselői az RBR családnak, mivel az általuk kódolt fehérjék mindegyike tartalmazza a RBR fehérjékre jellemző A és B pocket doméneket, hasonlóan az állati RBR-ekhez.

X. A rendelkezésre álló szekvencia adatbázisokra alapozva PCR és szekvenálási technikával meghatároztam a búza *RBR1* teljes és a *RBR2* részleges nukleotidsorrendjét. Ezen gének szintén új tagjai a növényi RBR családnak.

XI. Az izolált új *RBR* gének genomiális szerveződését megvizsgáltam, megállapítva, hogy ezen gének 18 exonba szerveződnek a növényi genomokban, valamint specifikus intron szerveződésükön keresztül megkülönböztethetők.

XII. Az *RBR* gének által kódolt fehérjék szekvenciáját CLUSTALW összehasonlító analízissel vizsgáltam. Erre alapozva elkészítettem egy filogenetikus fát, amely alapján a növényi RBR fehérjéket csoportosítani tudtam. Az I. alcsalád a kétszikű RBR fehérjéket, a II. alcsalád az egyszikű egyes típusú, illetve a III. alcsalád az egyszikűek kettes típusú RBR fehérjéit foglalja magába. Megállapítottam, hogy ezen alcsaládoknak jellegzetes lehetséges foszforilációs elrendeződésük van, amely feltételezésem szerint az egyes alcsaládok fehérjéinek funkcionális specifikitását adja.

XIII. Kvantitatív RT-PCR segítségével vizsgáltam az azonosított gének kifejeződését és bizonyítottam, hogy a rizs *RBR* gének nemcsak szerkezetükben különböznek, hanem szövetspecifikus kifejeződésükben is, azaz a rizs *RBR2* gén mRNS szintje a differenciálódott sejtekben magas, míg az *OsRBR1* gén transzkriptuma az aktívan osztódó sejtuszpenzióban és embriókban detektáltam nagyobb számban.

XIV. A rizs *RBR* gének kifejeződésének növénybeni lokalizációját *in situ* hibridizációs kísérletekkel vizsgáltam. Megállapítottam, hogy összhangban a kvantitatív PCR eredményekkel az *OsRBR2* gén a növény differenciálódott sejtjeiben fejeződik ki.

XV. Az RBR fehérjék közötti különbségeket élesztő két-hibrid módszerrel vizsgáltam. A fehérje kölcsönhatásokban azonosságokat és különbségeket határoztam meg, mint minden vizsgált növényi RBR kölcsönhatott a MSV vírus RepA fehérjével, ugyanakkor egy újonnan izolált fehérje, az OsRBRI2 csak a MsRBR és az OsRBR1 fehérjék esetén mutatott kölcsönhatást. Ezen eredményekkel bizonyítottam, hogy az egyszikű RBR alcsaládok funkcionálisan is különböznek, míg a kétszikűekben egyetlen RBR végzi ezen funkciókat.

VIII. IRODALOM JEGYZÉK

Ach, R.A., Durfee, T., Miller, A.B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P., Grissem, W. 1997. *RRB1* and *RRB2* encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell Biol.* 17: 5077-5086.

Ahuja, P.S., Pental, D., Cockind, E.C. 1982. Plant regeneration from leaf base callus and cell suspension of *Triticum aestivum*. *Z.Pflanzenzüchtg.* 81: 139-144.

Ausin, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, J.A., Ruiz-Garcia, L., Martinez-Zapater, J.M. (2004) Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nature Genetics* 36:162-6.

Ayaydin, F., Vissi, E., Mészáros, T., Miskolczi, P., Kovács, I., Fehér, A., Dombrádi, V., Erdődi, F., Gergely, P., and Dudits, D. (2000) Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G₂/M transition and early mitotic microtubule organization in alfalfa. *The Plant Journal* 23: 85-96.

Baldet, P., Hernould, M., Laporte, F., Mounet, F., Just, D., Mouras, A., Chevalier, C., Rothan, C. 2006. The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants. *J Exp Bot.* 57:961-70.

Barroco, R., De Veylder, L., Magyar, Z., Engler, G., Inze, D., Mironov, V. 2003. Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol. Life Sci.* 60:401-412.

Beach, D., Durkacz, B., Nurse, P. 1982. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 23:706-709.

Bernards, R., Schackelford, G.M., Gerber, M.R., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Schartl, M., Bogenmann, E., Rapaport, J.M., McGee, T., Dryja, T.P., és mts. 1989. Structure and expression of the murine retinoblastoma gene and characterization of its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6474-6478.

Boehmelt, G., Ulrich, E., Kurzbauer, R., Mellitzer, G., Bird, A., Zenke, M. 1994. Structure and expression of the chicken retinoblastoma gene. *Cell Growth Differ.* 5: 221-230.

Boniotti, M.B., Gutiérrez, C. 2001. A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J.* 28: 341–350.

Boudolf, V., Barroco, R., Engler Jde, A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., Inze, D., De Veylder, L. 2004. B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 16:945-55.

Brehm, A., Kouzarides, T. 1999. Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 24: 142-145.

Chen, M., Presting, G., Barbazuk, W.B., Goicoechea, J.L., Blackmon, B., Fang, G. és mts. 2002. An integrated physical and genetic map of the rice genome. *The Plant Cell* 14:537-545.

Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Claudio, P.P., Tonini, T., Giordano, A. 2002. The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biol.* 3: 3012.

Cooper, S. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*, Second Edition. Sinauer Associates Inc. ASM Press.

Cooper, S. 2003. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0 and G1 phase arrest points. FASEB 17:333-340.

Christensen, J.R., Borrino, E., Olesen, A., Andersen, A. 1997. Diploid, tetraploid, and octoploid plants from anther culture of tetraploid orchard grass, *Dactylis glomerata* L. Plant Breeding 116:267-270

Dahl, M., Meskiene, I., Bogre, L., Ha, D.T., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H., Heberle-Bors, E. 1995. The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G1 cyclin-deficient yeast and is induced in the G1 phase of the cell cycle. Plant Cell 7: 1847-1857.

den Boer, B.G., Murray, J.A.H. 2000. Triggering the cell cycle in plants. Trends Cell Biol. 10: 245-250.

Destree, O.H., Lam, K.T., Peterson-Maduro, L.J., Eizema, K., Diller, L., Gryka, M.A., Frebourg, T., Shibuya, E., Friend, S.H. 1992. Structure and expression of the *Xenopus* retinoblastoma gene. Dev. Biol. 153: 141-149.

De Veylder, L., Segers, G., Glab, N., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D. 1997. The Arabidopsis Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. FEBS Lett. 412:446-452.

De Veylder, L., Beemster, G., Beeckman, T., Inzé, D. 2000. CKS1At overexpression in Arabidopsis thaliana inhibits growth by reducing meristem size and inhibits cell-cycle progression. Plant J. 25:617-626.

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., Inzé, D. 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. Plant Cell 13:1653-1667.

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Engler, J.D.A., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacqmard, A., Engler, G., Inze, D. 2002.

Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. EMBO J. 21: 1360–1368.

Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J., Jacquard, A., Kilby, N., Murray, J. 2003. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. Plant Cell 15:79-92.

Dewitte, W., Murray, J.A.H. 2003. The plant cell cycle. Annu. Rev. Plant Biol. 54: 235-264.

Dorée, M., Hunt, T. 2002. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? J. Cell Sci. 115:2461-2464.

Dynlacht, B. 1997. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. Nature 389:149-152.

Evans, T., Rosenthal, E., Youngblom, J., Distel, D., Hunt T. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell 33:389-396.

Inzé, D., Gutiérrez, C., Chua, N.H. 1999. Trends in plant cell cycle research. Plant Cell 11: 991-994.

Inzé, D. 2005. Green light for the cell cycle. EMBO J. 24: 657-662.

Du, W., Vidal, M., Xie, J.E., Dyson, N. 1996. RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. Genes Dev. 10: 1206-1218.

Durfee, T., Feiler, H.S., Grussem, W. 2000. Retinoblastoma-related proteins in plants: homologues or orthologues of their metazoan counterparts? Plant Mol. Biol. 43: 635–642.

- Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12: 2245–2262.
- Ebel, C., Mariconti, L., Gruissem, W. 2004. Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* 17: 776-780.
- Ewen, M.E., Xing, Y.G., Lawrence, J.B., Livingston, D.M. 1991. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 66: 1155-1164.
- Fabian, T., Lorbiecke, R., Umeda, M., Sauter, M. 2000. The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta* 211:376-383.
- Felsenstein J. 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6a3. Distributed by the author Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Ferreira, P., Hemerly, A., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inzé, D. 1991. The *Arabidopsis* functional homolog of the p34^{cdc2} protein kinase. *Plant Cell* 3:531-540.
- Fisher, R.P., 1997. CDKs and cyclins in transition(s). *Current Opinion in Genetics & Development* 7:32-38.
- Fobert, P., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E., Doonan, J. 1996. Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* 8:1465-1476.
- Fotedar, R., Fotedar, A. 1995. Cell cycle control of DNA replication. *Prog. Cell Cycle Research* 1:73-89
- Fountain, M.D., Murray, J.A.H., Beck, E. 1999. Isolation and characterization of a plant retinoblastoma-related gene from a photoautotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Physiol.* 119: 336-363.

Felsenstein, J. 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6a3. Distributed by the author Department of Genetics, University of Washington, Seattle

Goodrich, J., Tweedie, S. 2002. Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 707–746.

Gordon-Kamm, W., Dilkes, B.P., Lowe, K., Hoerster, G., Sun, X., Ross, M., Church, L., Bunde, C., Farrel, J., Hill, P., és mts. 2002. Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:11975-11980.

Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., Larkins, B.A., DeCaprio, J.A., Sellers, W.R., Kaelin, W.G. 1996. A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8962-8967.

Granier, C., Inzé, D., Tardieu, F. 2000. Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34(cdc2) kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiol.* 124: 1393-1402.

Gutiérrez, C. 1998. The retinoblastoma pathway in plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 492–497.

Gutiérrez, C. 2000. Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.* 43: 763-772.

Gutiérrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., del Pozo, J.C. 2002. G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 480-486.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. 1994. The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994

Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., Robertson, D. 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35:105-140.

Harray, Y., Bellec, Y., Bellini, C., Faure, J.D. 2003. Hormonal control of cell proliferation requires PASTICCINO genes. *Plant Physiol.* 132:1217-1227.

Hartwell, L., Mortimer, T., Culotti, J., Culotti, M. 1973. genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of cdc mutants. *Genetics* 74:267-287.

Havelda, Z., Maule, A.J. 2000. Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell* 12:1975-1986.

Hemerly, A., Engler, J de A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D., Ferreira, P. 1995. Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncoupled cell division from iterative plant development. *EMBO J.* 15:3925-3936.

Hemerly, A., Ferreira, p., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D. 2000. Cell division events are essential for embryo patterning and morphogenesis: studies on dominant-negative cdc2aAt mutants of *Arabidopsis*. *Plant J.* 23:123-130.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-82.

Ho, A., Dowdy, S.F. 2002. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 47-52.

Horváth, G.V., Pettko-Szandtner, A., Nikovics, K., Bilgin, M., Boulton, M., Davies, J.W., Gutiérrez, C., Dudits, D. 1998. Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis. *Plant Mol. Biol.* 38: 699-712.

Hunt, T., Nasmyth, K. 1997. Cell multiplication. *Curr Opin Cell Biol.* 9:765-767.

Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makkerh, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Gutiérrez, C., Doonan, J.H., Murray, J.A.H. 1998. The maize retinoblastoma protein

homologue ZmRb-1 is regulated during maize leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol. Biol.* 37: 155–169.

Huntley, R.P., Murray, J.A.H. 1999. The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 440–446.

Huppi, K., Siwarski, D., Mock, B.A., Dosik, J., Hamel, P.A. 1996. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the mouse p107 gene. *Mamm. Genome* 7: 353-355.

James, P., Halladay, J., Graig, E.A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.

Imajuku, Y., Hirayama, T., Endoh, H., Oka, A. 1992. Exon-intron organization of the *Arabidopsis thaliana* protein kinase genes CDC2a and CDC2b. *FEBS L.* 304:73-77.

Inzé, D., Gutiérrez, C., Chua, N.H. 1999. Trends in Plant Cell Cycle Research. *Plant Cell* 11: 991-994

Inzé, D. 2005. Green light for the cell cycle *EMBO J.* 24: 657-662.

Iwakawa, H., Shinmyo A., Sekine, M. 2006 *Arabidopsis CDKA;1*, a *cdc2* homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *The Plant Journal* 45: 819-381.

James, P., Halladay, J., Graig, E.A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436.

Jiang, Z., Zacksenhaus, E., Gallie, B.L., Philips, R.A. 1997. The retnoblastoma gene family is differentially expressed during embryogenesis. *Oncogene* 14: 1789-1797.

Joubès, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., Renaudin, J.P. 2000. CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:607-620.

Keller, S.A., Ullah, Z., Buckley, M.S., William Henry, R., Arnosti, D.N. 2005. Distinct developmental expression of *Drosophila* retinoblastoma factors. *Gene Expr. Patterns* 5: 411-421.

Kong, L.J., Orozco, B.M., Roe, J.L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H.S., Durfee, T., Miller, A.B., Grussem, W., Robertson, D., Hanley-Bowdoin, L. 2000. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* 19: 3485–3495.

Koroleva, O.A., Tomlinson, M., Parinyapong, P., Sakvarelidze, L., Leader, D., Shaw, P., Doonan, J.H. 2004. CycD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases. *Plant Cell* 16:2363-2379.

Kosugi, S., Ohashi, Y. 2002. Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol.* 128:833-843.

Lee, W.H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.J., Shew, J.Y., Lee, E.Y. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235: 1394-1399.

Lee, J., Das, A., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., Umeda, M. 2003. Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *Plant J.* 34:417-25.

Li, L., Qu, R., de Kochko, A., Fauquet, C., Beachy, R.N. 1993 An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* 12: 250-255.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.

Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolczi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M. 1997. Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9:223-235.

Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S., Inzé, D. 2000. Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 486:79-87.

Mayol, X., Grana, X., Baldi, A., Sang, N., Hu, Q., Giordano, A. 1993. Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 8: 2561-2566.

Meijer, M., Murray, J. 2000. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.* 43:621-633.

Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., Murray, J. 2002. Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem* 277:41987-42002.

Meszaros, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Pettko-Szandtner, A., Peres, A., Magyar, Z., Horvath, G.V., Bako, L., Feher, A., Dudits, D. 2000. Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol Biol.* 43:595-605.

Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M., Inzé, D. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in higher plants - the nexus. *Plant Cell* 11:509-521.

Mosquana, A., Katz, A., Shochat, S., Grafi, G., Ohad, N. 2004. Interaction of FIE, a polycomb protein, with pRb: a possible mechanism regulation endosperm development. *Mol. Genet. Genomics* 271:651-657.

- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L., Robertson, D. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7:705-719.
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H., Shinmyo, A. 1999. Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D *in vitro*. *Plant J.* 18: 243–252.
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M., Shinmyo, A. 2002. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S phase transition in tobacco. *Plant Cell* 14: 1847–1857.
- Nakagami, T., Kumagai, F. 1999 Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods Cell Science* 21:123-7.
- Nurse, P., Thuriaux, P. 1980. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 96:627-637.
- Ohashi, M., Taguchi, T., Ikegami, S., 1978. Aphidicolin: a specific inhibitor of DNA polymerases in the cytosol of rat liver. *Biochem Biophys Research Communication* 82:1084-1090
- Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L., Skriver, K. 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 10:79-87.
- Park, J.A., Ahn, J.W., Kim, Y.K., Kim, S.J., Kim, J.K, Kim, W.T., Pai, H.S. 2005 Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. *Plant Journal* 42: 153-163.

Peres, A., Ayaydin, F., Nikovics, K., Gutierrez, C., Horvath, G.V., Dudits D., Feher, A. 1999 Partial synchronization of cell division in cultured maize (*Zea mays* L.) cells; differential cyclin, cdc2, histone, and retinoblastoma transcript accumulation during the cell cycle. *Journal of Experimental Botany* 50:1373-1379

Pertile, P., Baldi, A., De Luca, A., Bagella, L., Virgilio, L., Pisano, M.M., Giordano, A. 1995. Molecular cloning, expression, and developmental characterization of the murine retinoblastoma-related gene Rb2/p130. *Cell Growth Differ.* 6: 1659-1664.

Pettko-Szandtner, A., Meszaros, T., Horvath, G.V., Bako, L., Csordas-Toth, E., Blastyak, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P., Dudits, D. 2006. Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J.* 46:111-123.

Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R.P., Casteels P., Van Montagu M., Inze D., Mironov V. 2001. A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* 28:36354-60.

Robbens, S., Khadaroo, B., Camasses ,A., Derelle, E., Ferraz, C., Inze, D., Van de Peer, Y., Moreau, H. 2005. Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in the Unicellular Green Alga *Ostreococcus tauri* *Mol. Biol. Evol.* 22: 589-597.

Rossi, V., Varotto, S. 2002. Insights into the G1/S transition in plants. *Planta* 215: 345–356.

Rossi, V., Locatelli, S., Lanzanova, C., Boniotti, B., Varotto, S., Pipal, A., Goralik-Schramel, M., Lusser, A., Gatz, C., Gutiérrez, C. 2003. A maize histone deacetylase and retinoblastoma-related protein physically interact and cooperate in repressing gene transcription. *Plant Mol. Biol.* 51: 401–413.

Roudier, F., Fedorova, E., Györgyey, J., Fehér, A., Brown, S., Kondorosi, A., Kondorosi, E. 2000. Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J.* 23: 73-78.

Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R.A., Hensgens, L.A.M. 1994 Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36:259-264

Sabelli, P.A., Dante, R.A., Leiva-Neto, J.T., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J., Larkins, B.A. 2005. RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102:13005-13012.

Sabelli, P.A., Larkins, B.A. 2006. Grass like mammals? Redundancy and compensatory regulation within the retinoblastoma protein family. *Cell Cycle* 5:352-355.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, 2nd edn. NY: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Savoure, A., Feher, A., Kalo, P., Petrovics, G., Csanadi, G., Szecsi, J., Kiss, G., Brown, S., Kondorosi, A., Kondorosi, E. 1995. Isolation of a full-length mitotic cyclin cDNA clone CycIIIMs from *Medicago sativa*: chromosomal mapping and expression. *Plant Mol Biol.* 27:1059-70.

Sawada, Y., Nomura, H., Endo, Y., Umeki, K., Fujita, T., Ohtaki, S., Fujinaga, K. 1997. Cloning and characterization of the rat p130, a member of the retinoblastoma gene family *Biochim. Biophys. Acta* 1361: 20-27.

Schiestl, R.H., Gietz, D. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16: 339-346.

Segers, G., Gadisseur, I., Bergounioux, C., de Almeida Engler, J., Jacquard, A., Van Montagu, M., Inzé, D. 1996. The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *Plant J.* 10:601-612.

- Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A. 1999. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Letters* 460:117-122.
- Settlage, S.B., Miller, A.B., Gruissem, W., Hanley-Bowdoin, L. 2001. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology* 279:570-576.
- Shimotohno, A., Matsubayashi, S., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Umeda, M. 2003. Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS L.* 534:69-74.
- Smith, L., Ecker, R. 1971. The interaction of steroidis with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Devel. Biol.* 25:232-247
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., Murray, J.A.H. 1995. A family of cyclin-D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85-103.
- Stals, H., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D. 2000. Regulation of cyclin-dependent kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 43:583-593.
- Stevaux, O., Dimova, D., Frolov, M.V., Taylor-Harding, B., Morris, E., Dyson, N. 2002. Distinct mechanisms of E2F regulation by *Drosophila* RBF1 and RBF2. *EMBO J.* 16: 4927-4937.
- Tedesco, D., Lukas, J., Reed, S.I. 2002. The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev.* 16: 2946-2957.
- Thomas, J. 1993. Thinking about genetic redundancy. *Trends Genet* 9:395-398.

Traas, J., Laufs, P. 1998. Cell cycle mutants in higher plants: a phenotypical overview. D. Francis, D. Dudits, D. Inzé (szerk.) Plant Cell Division, (Portland Press Research Monograph X). Portland Press, London, 319-336 oldal.

Umeda, M., Bhalerao, R., Schell, J., Uchimiya, H., Koncz, C. 1998. A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5021-5026.

Umeda, M., Umeda-Hara, C., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., Uchimiya, H. 1999. Differential expression of genes for cyclin-dependent kinases in rice plants. Plant Physiol. 119:31-40.

Umeda, M., Umeda-Hara, C., Uchimiya, H. 2000. A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13396-13400.

Umen, J.G., Goodenough, U.W. 2001. Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in *Chlamydomonas*. Genes Dev. 15: 1652-1661.

Voorhoeve, P.M., Hijmans, M.E., Bernards, R. 1999. Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. Oncogene 18: 515-524

Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., Fowke, L. 2000. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. Plant J. 24:613-623.

Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81: 323–330.

Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J.M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Grissem, W., Scheres, B. 2005. The retinoblastoma-related gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. Cell 123:1337-1349.

Wyrzykowska, J., Schorderet, M., Pien, S., Gruissem, W., Flemming, A.J. 2006. Induction of differentiation in the shoot apical meristem by transient overexpression of a retinoblastoma-related protein. *Plant Physiol.* 141:1338-1348.

Xiao, B., Spencer, J., Clements, A., Ali-Khan, N., Mittnacht, S., Broceno, C., Burghammer, M., Perrakis, A., Marmorstein, R., Gamblin, S. 2003. Crystal structure of the retinoblastoma suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100: 2363-2368.

Xie, Q., Suárez-López, P., Gutiérrez, C. 1995. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J.* 14: 4073-4082.

Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J., Gutierrez, C. 1996. Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15: 4900–4908.

Yamaguchi, M., Fabian, T., Sauter, M., Bhalerao, R., Schrader, J., Sandberg, G., Umeda, M., Uchimiya, H. 2000. Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant J.* 24:11-20.

Yan, Y., Mumby, M.C. 1999. Distinct roles for PP1 and PP2A in phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Journal of Biol. Chem.* 274: 31917-31924

Yarbro, J.W. 1967. The effect of deoxyribonucleoside and ribonucleoside addition on the inhibitory effect of hydroxyurea on deoxyribonucleic acid synthesis. *Biochem Journal* 104:52-53

Zamora, A.B., Scott, K.J. 1983. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. *Plant Sci. Lett.* 29: 183-189.

Zhang, H.S., Dean, D.C. 2001. RB-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* 20: 3134-3138.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Prof. Dudits Dénesnek és Dr. Györgyey Jánosnak a lehetőséget, hogy Ph.D. éveim alatt irányításuk alatt dolgozhattam.

Rendkívül sok segítséget kaptam Török Katalintól, aki mindig lelkes és segítőkész volt munkám során.

Megkülönböztetett köszönet illeti Kotogány Editnek, Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak, Dr. Nikovics Krisztinának, Dr. Kelemen Zsoltnak.

Köszönetem fejezem ki a Sejtosztódási és Differenciálódási csoport valamennyi munkatársának, akik munkám sikeréhez bármilyen módon hozzájárultak.

Köszönetet mondok az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetének, hogy munkámhoz a feltételeket készségesen biztosították.

Köszönöm az MBK-ban dolgozó Növényi Virologia csoportnak, hogy lehetőséget nyújtottak az *in situ* hibridizációs technika megtanulására és kivitelezésére.

Szeretetteljes köszönetem fejezem ki szüleimnek és testvéreimnek, akik tanulmányaim során mindvégig bíztattak, támogattak, és gondoskodtak.

Végtelen hálával tartozom **férjemnek**, hogy munkám során kitartott mellettem, gondoskodásával éltetett, és szerelmével erősített.

X. PUBLIKÁCIÓS LISTA

X.1. A dolgozat alapját képező publikációk:

Lendvai Á., Csordás-Tóth É., Pettkó-Szandtner A., Horváth H.V., Györgyey J., Dudits D. (2007) Dicot and monocot plants differ in Retinoblastoma-related protein subfamilies. *Journal of Experimental Botany* 58(7):1663-1675

Lendvai Á., Pettkó-Szandtner, Horváth V.G., Csordás-Tóth É., Györgyey J., Dudits D. (2004) The number of retinoblastoma genes may reflect phylogenetic divergence of dicot and monocot plants. Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology, *Comparative Biochemistry and Physiology* 137(3):S248

Lendvai Á., Nikovics K., Bakó L., Dudits D., Györgyey, J. (2002) Synchronization of *Oryza sativa* L. cv. Taipei-309 cell suspension culture Proceedings of the 7th Hungarian Congress of Plant Physiology *Acta Biologica Szegediensis* 46(3-4): 39-41

X.2. Egyéb publikációk:

Miskolczi P., Lendvai Á., Horváth G. V., Pettkó-Szandtner A., Dudits D. (2007) Conserved functions of retinoblastoma proteins: From purple retina to green plant cells. *Plant Science* 172 (4): 671-683

Csordás-Tóth É., Kiss A., Lendvai Á., Dudits D., Vandepoele K., Inzé D. (2004) Transcript profiling in synchronized rice cells Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology, *Comparative Biochemistry and Physiology* 137(3):S247

Dorjgotov D., Szűcs A., Ötvös K. Szakonyi D., Kelemen Zs., Lendvai Á., Pónya Zs., Barnabás B., Brown S., Dudits D., Fehér A. (2003) Specific features of RHO GTPase-dependent signalling in plants. *Cell Biology International* 27(3):191-2

Göntér I., Szarka B., Lendvai Á., Molnár-Láng M., Mórocz S., Dudits D. (2002) Problems and possibilities of wheat-maize somatic hybridization Proceedings of the 7th Hungarian Congress of Plant Physiology *Acta Biologica Szegediensis* 46(3-4): 11-12

XI. PhD theses

In the past decade attention has particularly increased for plant cell division, since novel cell-cycle characteristics were discovered apart from the conserved basic mechanisms, which can be found only in plants. Cell division research requires knowledge in more details and for such researches plants give an exceptional opportunity. In contrast to animals, growth of plants is considerably postembryonic. The new organs, such as the root, the stem, the leaves and flowers are from the division of the so-called „life-long” cells, which is followed by plant growth and differentiation. This specific cell zone is the meristem. The leaves and flowers develop from the shoot meristem, while the root meristem provides new cells in the growing root. Based on these characteristics plants are very suitable targets to simultaneously study cell cycle, growth and development of multicellular living beings.

The regulation of the cell cycle is a very complicated and complex process, in which both inner and outer cell factors play part. Inside the cell the most important regulators of the cell cycle are protein-complexes, which consist of catalytic and regulating subunits. Both cyclins and cyclin dependent kinases have many forms. Present of cyclin-CDK complexes, having the most important role in the cell cycle coordination, regulates different checkpoints of the cell cycle. Formation of protein complex is preceded by the increasing level of cyclin, which is in turn usually the outcome of some other indicating factors (for example growth factors) (Dymlach, 1997).

To study the biochemistry and molecular biology of cell division it is essential to have a cell system, where the division of cells within a population can be synchronized. The most suitable system to examine the cell cycle proved to be the *in vitro* plant cell culture, because most of the cells are active and dividing, therefore it passes through certain phases of the cell cycle. In this system the cell division can be influenced in many ways. Through the use of reversible inhibitors, that can stop cell cycle at certain points, cells will get into the same phase, to a so-called synchron. With these experimental systems we can fully analyse the regulating units of cell cycle.

The cyclin dependent kinases (CDK) are one of the most important coordinators of the eukaryotic cell cycle regulation. These serin-treonin protein

kinases – considering their function regulating the cell cycle – bind cyclins (by forming complexes) and determine cell division steps. The plant CDK proteins (in harmony with the animal systems) are functionally grouped and distinguished with letters (CDKA, B, D, E, F). In plants the CDKA proteins contain a PSTAIRE sequence motive in their cyclin-binding domain and these kinases regulate the G1/S and G2/M transitions. Four B-Type CDKs are known, which are plant-specific CDKs harbouring the typical PPTALRE or PPTTLRE motif, which accumulate in the G2 and M phase and regulate the G2/M transition.

Cell division is a determining mechanism in the development of the plant, although the full regulating process is not known yet, so it is presumed that the different CDKs have a key role. We can assess the role of these proteins in the regulation of cell cycle, in the plant growth by the nowadays well-known transgenic plant lines overproducing or depleting expression of the target gene.

The different CDK-cyclin complexes achieve their regulatory function throughout the cell cycle process by forming connection with other proteins. The retinoblastoma proteins present substrates of CDK cyclin complexes, which have an important role in the regulating steps of the cell cycle. During the G1/S phase transition the CycD/CDK complex phosphorylates the RBR protein, in this way the E2F transcription factor is released from the inhibition and directs the cells into S phase. Viruses use also this regulating step to multiply their genetic information. RBR regulates processes outside and within the cell cycle through formation of different protein-protein interactions, as for example with the FVE protein, which is part of a protein-complex, that represses transcription of FLC (Flowering Locus C), thereby regulating flowering. Examinations of plant RBR proteins help us to obtain further insight in the regulating function of RBR.

In the case of monocotyledonous plants cell cycle studies need a well established synchronization system, as known published data, at the tobacco BY-2 cell-line, with that we could widen our knowledge in the field of examining the cell cycle of the monocotyledons, at the same time it could provide to get to know the evolutionary differences between monocotyledonous and dicotyledonous plants.

For this reason we choose to optimize synchronization technique and we developed this method for our experimental model organism, the rice. With our experiments, we tried to increase further our knowledge, to help to understand the cell cycle regulation.

The central role of cyclin dependent kinases (CDK) was already proved in cell cycle regulation. The aim of our work was to get further insight on the effects of CDK kinases on cell division and on plant growth and development. For this study we chose to create and examine transgenic plants overproducing the chosen kinases.

It is known, that the basic mechanisms of living organisms are similar, so the regulating elements of cell cycle are preserved as well. From these basic regulating components we chose the plant RBR genes, as one of the most interesting modulator of cell cycle. Our aim was especially to identify, compare and examine rice RBR proteins.

XI.1. Synchronization of rice cells

I. I performed synchronization experiments to study the plant cell cycle through measuring the differences in DNA content (resulted from changes of the nucleus) during the division cycle using flow cytometry. First of all I determined the suitable blocking-material and optimised the circumstances of its use. First, I treated the cell cultures with hidroxyurea and after removing the impending agent I detected the DNA content changes of the nucleus of the two rice cultures by flow cytometer. I can state based on the synchronization experiments that hidroxyurea stopped most of the cells in the G1/S phase, while after the washing step cells continued their cell cycle, soon they proceeded into the G2/M phase.

II. From the synchronization experiment of the Unggi9 cell culture I determined the duration of the cell cycle, where the G2 phase and the mitosis were detected at around 21 hours.

III. At the experiments on the Taipei-309 cell-line I observed, that the blocked and then reactivated cells of the cell culture were in phase G2 at 12-15 hours. During the experiments with the two different cell cultures I observed significant differences between the varieties, which are very important in the case of comparative analyses.

IV. I proved that the synchronization experiment on the Taipei-309 cell culture was successful by examining the expression of cell cycle specific genes with quantitative RT-PCR, which in the following experiments is an important technique of studying the cell cycle.

XI:2. Studying the overproduction of Medicago CDK proteins in rice plants

V. During my work I created transgenic rice plants overproducing *Medicago* CDK proteins to study the effects of these proteins on cell cycle, plant growth and development.

VI. In the Medsa;CDKA1;1 protein overproducing transgenic plants I detected a change in the number of rice seeds, which suggests that the CDKA1 kinases have a role in regulating the cell division, and they also influence the development of the generative organs.

VII. During my studies I observed a phenotype change in the Medsa;CDKB1;1 kinase overproducing rice plants, which means that the size of these transgenic plants was smaller than the control plants.

VIII. From the mitotic kinases I carried out experiments with the Medsa;CDKB2;1 by creating these transgenic kinase overproducing plants. I observed that these modified plants flowering earlier than the control plants.

XI:3. Studying the plant RBR genes

IX. During my work I described the rice *RBR* genes and the *Medicago RBR* gene. These plant genes are new representatives of the RBR family, as the proteins coded by them contains A and B pocket domains which are the characteristics of RBR proteins, similarly to animal RBRs.

X. Based on the available sequence database I determined the *TaRBR1* total and the *TaRBR2* partial nucleotide sequence of the wheat using PCR and sequencing. These genes present also new members of plant RBR family.

XI. I examined the genomic organization of newly isolated *RBR* genes, determining that these genes are organized into 18 exons in plant genomes and they can be differentiated through their specific intron organization.

XII. I examined the *RBR* genes coded protein sequences with a comparative analysis using CLUSTALW. Based on the alignment I created a filogenetic tree, that helped to group the plant RBR proteins. Subfamily I. includes the dicotyledonous RBR proteins, subfamily II. contains monocotyledonous type one, while subfamily III. includes monocotyledonous type two RBR proteins. I determined, that these subfamilies have typical possible phosphorylating pattern, which might distinguish the functional specification of the proteins in each subfamily.

XIII. By quantitative RT-PCR I examined the expression of identified genes and proved, that the rice *RBR* genes are not only differ in their structure, but in their tissue-specific expression as well, which means, that the mRNA level of the rice *RBR2* gene is high in the differentiated cells, while I detected larger amount of *OsRBR1* gene transcript in the actively dividing cell suspension and embryos.

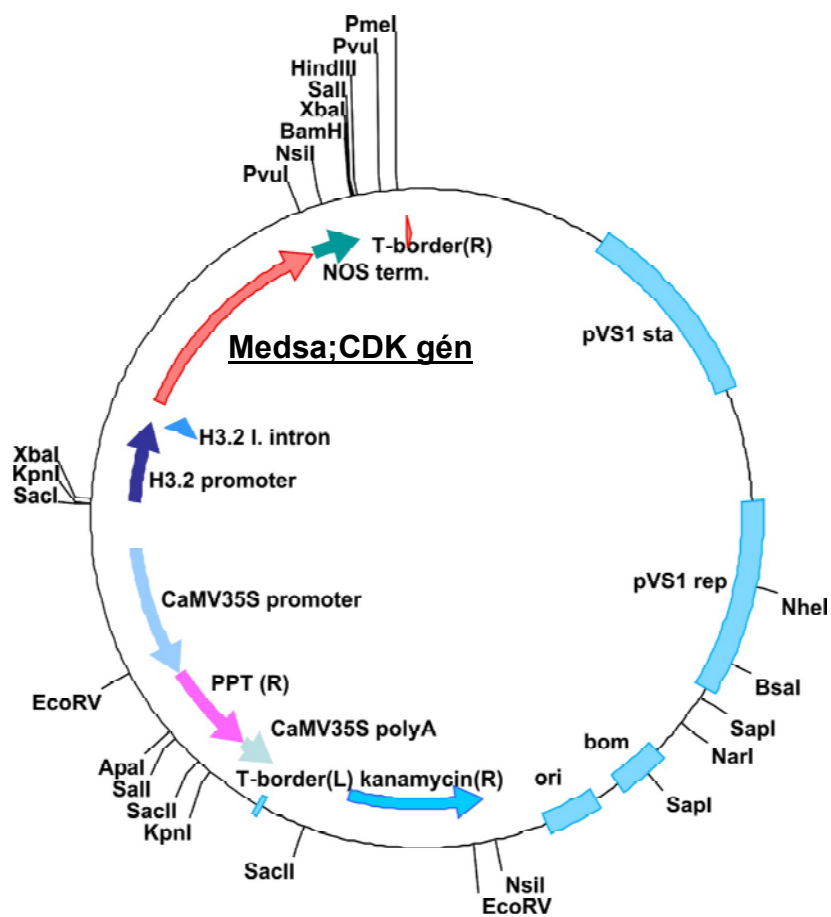
XIV. I examined the localization of the rice *RBR* genes expression in plant with *in situ* hybridization experiments. I determined, in harmony with the quantitative PCR results that the *OsRBR2* gene is expressed in the differentiated cells of the plant.

XV. I examined the differences between the RBR proteins with yeast two-hybrid method. I determined similarities and differences in the protein interactions. Every examined plant RBRs interacted with the RepA protein of the MSV virus, while on the other hand a newly isolated protein, the OsRBRI2 interacted only with the MsRBR and the OsRBR1 proteins. With these results I also proved, that the

monocotyledonous RBR subfamilies are functionally differentiated, while in dicotyledons only one RBR performs these functions.

XII. Függelék

A pCHD2A, pCHD2D és pCHD2F vektorok felépítése.



Tápanyagok összetételei.

AA tápanyag

Makroelemek	(mg/l)	Vitaminok	(mg/l)
KCl	2950	Inositol	100,00
CaCl ₂ x 2H ₂ O	150	Thiamine B1	10,00
MgSO ₄ x 7H ₂ O	500	Hicot. Acid B3	1,00
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150	Pyridoxine B6	1,00
Mezoelemek		Glycine	7,50
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,80	Glutamine	876,00
Na ₂ -EDTA	37,30	Asparagine	266,00
Mikroelemek		Arginine	174,00
MnSO ₄ x 4H ₂ O	13,50		
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2,00	Szacharóz	30 g/l
H ₃ BO ₃	3,00	2-4 D	2,5 mg/l
KJ	0,75		
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25		
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025		
CoCl ₂ X 6H ₂ O	0,025		

G1 tápanyag

KNO ₃	3000 (mg/l)	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025 (mg/l)
NH ₄ H ₂ PO ₄	400 (mg/l)	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25 (mg/l)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	166 (mg/l)	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025 (mg/l)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	185 (mg/l)	Tiamin x HCl	1,0 (mg/l)
Na ₂ Fe-EDTA	42,1 (mg/l)	Piridoxin x HCl	0,5 (mg/l)
MNSO ₄ x 4H ₂ O	4,4 (mg/l)	Nikotinsav	0,5 (mg/l)
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1,5 (mg/l)	Glicin	2,0 (mg/l)
H ₃ BO ₃	1,6 (mg/l)	2,4-D	1,0 (mg/l)
KI	0,8 (mg/l)	Szacharóz	30,0 g/l

Real-time PCR során használt oligonukleotidok.

Gén	Szensz	Antiszensz
aktin	CTCGTCAGGCTTAGATGTGCTAGAT	TGAACAATGCTGAGGGATTCAA
MsRBR	CCCAAGCCTTCCTGACATGT	TTGGATGACCGTAATGGAGAGA
OsRBR1	CTCCTATCCAGCATGTCATCCTT	AGCCTTGACACACAGTAAAGAACAA
OsRBR2	TGGCCCCTCCGTGTGA	TGACGCCATGAAAGAGCTACA
OsCycA1;1	ACAATCTACTTTCTTACCCTCCTTCACT	GCTTTGTTGGCTGCAGTATGAAT
OsCycB2;1	GCCTCCTTGACGCGAAAA	CAGACGACCGCTGCATCA